

VINÍCIUS MILANI BUDEL

RELAÇÃO DA ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE
IMAGEM MORFONUCLEAR ENTRE O CÂNCER DA
MAMA QUE OCORRE NO CICLO GRAVÍDICO -
PUERPERAL E FORA DELE - ANÁLISE
COMPARATIVA DE 110 CASOS

Tese apresentada ao colegiado do curso de
Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica -
Doutorado do Setor de Ciências da Saúde da
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ,

Orientador: Prof. Andreas Danguy PhD.

Curitiba
1994

MILANI BUDEL, Vinicius

Relação da análise computadorizada de imagem morfonuclear entre o câncer da mama que ocorre no ciclo gravídico-puerperal e fora dele - análise comparativa de 110 casos.

____Curitiba, 1994. 91p. 28cm.

(Tese - Doutorado - Universidade Federal do Paraná)

Orientador: Prof. Andreas Danguy PhD.

1. Câncer de mama na gravidez
2. Análise de imagem
3. Morfologia nuclear
4. Ploidia
5. Ácido desoxirribonucleico

VINÍCIUS MILANI BUDEL

RELAÇÃO DA ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE
IMAGEM MORFONUCLEAR ENTRE O CÂNCER DA
MAMA QUE OCORRE NO CICLO GRAVÍDICO -
PUERPERAL E FORA DELE - ANÁLISE COMPARATIVA
DE 110 CASOS

Tese aprovada com conceito “A” e equivalência de nota “10” como requisito parcial para obtenção do grau acadêmico de Doutor no curso de Pós-Graduação de Clínica Cirúrgica, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Flávio Bortolozzi.

Dep. de Informática, Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná.

Prof. Dr. Laerte Justino de Oliveira.

Dep. Tocoginecologia, Universidade Federal do Paraná.

Prof. Dr. Osvaldo Malafaia.

Dep. de Cirurgia, Universidade Federal do Paraná.

Dep. de Cirurgia, Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

Prof. Dr. Robert Kiss.

Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Livre de Bruxelas.

Prof. Dr. Sergio Brener.

Dep. de Cirurgia, Universidade Federal do Paraná.

Dep. de Cirurgia, Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

Scientia vincere tenebras

Universidade Livre de Bruxelas

Aos meus pais

*Anelise, João Henrique
e Lucas,*

Razão de minha existência

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível graças aos estudos desenvolvidos no INSTITUT JULES BORDET (Centro de Tumores da Universidade Livre de Bruxelas) e Laboratório de Histologia pelo Prof. Dr. ROBERT KISS que desenvolve pesquisa em inteligência artificial aplicada ao câncer. Devo-lhe a orientação de duas teses e trabalhos de pesquisas desenvolvidos em intercâmbio científico com o Brasil. Em seu laboratório acolheu com humanismo e respeito a mim e aos demais alunos que com ele aprenderam. Agradeço ainda aos Prof. Dr. Jean-Lambert Pasteels, chefe do Serviço de Histologia da ULB, e ao Prof. Dr. Andreas Danguy orientador desta tese.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Plinio Gasperin Jr. que incentivou esta linha de pesquisa. Com ele, meu amigo, divido os méritos deste trabalho. As falhas atribuo somente a mim, aprendiz de tema tão complexo.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia agradeço o estímulo que me tem proporcionado para a vida acadêmica. Estímulo transmitido pelo exemplo e pela maneira como passo a passo vem aconselhando minha carreira quando me deparo com algumas encruzilhadas.

Ao Prof. Dr. Laerte Justino de Oliveira, agradeço o privilégio tê-lo como chefe que acreditou nas minhas possibilidades de escrever esta tese, antes de eu mesmo ter acreditado.

À Prof. Dra. Tereza Cristina Cavalcanti agradeço ter cedido incontáveis horas de trabalho procurando blocos de tumores, até que estes tivessem qualidade para o processamento citológico. Estas horas foram no período de Natal; assim, estendo o agradecimento à sua família.

Ao Prof. Dr. Giovanni Loddo, e ao Prof. Dr. Acir Mulinari, agradeço por terem com desprendimento cedido parte de seus acervos tão valiosos a este trabalho.

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Departamento de Tocoginecologia na pessoa do Prof. Dr. Helcio Bertolozi Soares, chefe do departamento agradeço, a oportunidade de poder ter feito o levantamento dessa pesquisa, que requereu a memória de seu serviço.

Ao Hospital Erasto Gaertner, na pessoa do Prof. Dr. Sérgio Bruno B. Hatschbach que tratou muitos destes casos, somou com sua experiência clínica, cedeu todos os dados de arquivo clínico e incentivou este trabalho.

Ao Hospital Evangélico de Curitiba que mantém há mais de dez anos o convênio interuniversitário com a Universidade Livre de Bruxelas, permitindo dessa forma reunir a prática clínica com a pesquisa avançada.

Ao Departamento de Informática da Escola Técnica Federal do Paraná em nome do Prof. Dr. Flavio Bortolosi pelo entusiasmo e incentivo com a análise de imagens informatizadas e sua aplicação na área médica, que permitiu a continuidade deste estudo em nosso meio através de convênio interuniversitário e o fácil acesso que proporciona entre estas duas ciências. Foi também de grande importância seus conhecimentos para correção dos termos técnicos e iconografia deste trabalho.

À Universidade Livre de Bruxelas, escola de “livres pensadores”, que funda os seus ensinamentos e pesquisas sobre o princípio do “livre exame”, isto é, preconiza em todas as matérias, a rejeição do argumento de autoridade e a independência do julgamento.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Generalidades.....	2
1.2 Considerações biológicas do câncer de mama na gravidez.....	4
1.3 Pesquisa de novos marcadores em patologia ligados ao câncer Generalidades.....	6
1.4 O utensílio informático e estatístico para a ajuda da caracterização da agressividade do câncer.....	10
1.4.1 A citometria de fluxo.....	10
1.4.2 A citofotometria aplicada a coloração de Feulgen.....	12
1.5 Descrição de certos parâmetros calculados pelo computador que podem servir de marcadores de agressividade de tumores malignos.....	14
1.5.1 Parâmetros ligados à morfologia do núcleo celular.....	14
1.5.2 Parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular.....	15

1.5.3	Parâmetros ligados à textura, à organização, e à distribuição da cromatina do núcleo celular.....	15
1.6	Objetivo do trabalho.....	17
2.0	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.0	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Obtenção do material.....	24
3.2	Obtenção da coloração por um analisador de imagem.....	24
3.3	Equipamento de análise: O analisador de imagens.....	25
3.4	Princípio de captura e segmentação de imagem.....	26
3.5	Descrição dos parâmetros calculados pelo computador.....	29
3.6	Cálculo do índice de proliferação.....	34
3.7	Faces da cromatina.....	34
3.8	Matrizes de secção longa.....	34
3.9	Matrizes de co-ocorrência.....	37
3.10	Descrição sumária das análises matemáticas e estatísticas.....	38
3.10.1	Análise univariada.....	38
3.10.2	Análise multivariada.....	39
4.0	RESULTADOS.....	42
5.0	DISCUSSÃO.....	68
6.0	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

(PARÂMETRO)

ADN:	ÁCIDO DESOXIDORIBONUCLEICO	
C:	CONTRASTE	15
CV:	COEFICIENTE DE VARIÂNCIA DA MATRIZ	14
DI:	DNA ÍNDICE	
DOI:	DENSIDADE ÓPTICA INTEGRA	2
DOM:	DENSIDADE ÓPTICA MÉDIA	3
E:	ENERGIA	13
GLD:	“GRAY LEVEL DISTRIBUTION”	9
HE:	HEMOTOXILINA EOSINA	
IOD:	DENSIDADE ÓPTICA INTEGRADA	2
K:	ÍNDICE DE KURTOSIS	6
LM:	“LOCAL MEAN”	12
LRL:	“LONG RUN LENGHT EMPHASIS”	8
NA:	ÁREA NUCLEAR	1
RLD:	“RUN LENGTH DISTRIBUTION”	10
RLP:	“RUN LENGTH PERCENTAGE”	11
SK:	ÍNDICE DE SKEWNESS	4
SRL:	“SHORT RUN LENGTH EMPHASIS”	7
SURF:	SUPERFÍCIE	1
VOD:	VARIÂNCIA DE DENSIDADE ÓPTICA	5

LISTA DE TABELAS

- 1 Classificação em tipos de histograma dos casos estudados... 66
- 2 Apresentação dos números absolutos e em porcentagem,
dos tumores classificados com tipo de histograma I, II, III,
IV, V versus tipo de histograma VI..... 67

LISTA DE GRÁFICOS

1 Representação gráfica da média (mais ou menos erro padrão) da área nuclear dos grupos em estudo.....	48
2 Representação gráfica da média (mais ou menos erro padrão) do índice de “Skewness” (SK).....	49
3 Representação gráfica da média (mais ou menos erro padrão) da frequência de curtas secções de cromatina (SRL) nucleares....	50
4 Representação gráfica da média (mais ou menos erro padrão) da frequência de longas secções de cromatina (LRL) nucleares....	51
5 Representação gráfica da média (mais ou menos erro padrão) do parâmetro “local mean” (LM).....	52
6 Representação gráfica da média (mais ou menos erro padrão) do parâmetro contraste (C).....	53
7 Análise multivariada dos 15 parâmetros - transformação canônica.....	54
8 Sequência da purificação matemática.....	55
9 Núcleos da área específica (EA) e (EB).....	56
10 Núcleos da área específica (EC) e (ED).....	57
11 Banco de dados purificados.....	58
12 Populações celulares purificadas.....	59
13 Núcleos individualizados.....	60
14 Resultante dos 15 vetores.....	61
15 Representação gráfica da média (mais ou menos erro padrão) da área nuclear dos grupos de estudo.....	62
16 Representação gráfica da média (mais ou menos erro padrão) da densidade óptica integrada (DOI) dos grupos de estudo.....	63
17 Representação gráfica da média (mais ou menos erro padrão) da frequência de curtas secções de cromatina (SRL) nucleares.	64
18 Representação gráfica da média (mais ou menos erro padrão) da condensação global da cromatina.....	65

LISTA DE FIGURAS

1	Representação da proliferação tumoral.....	9
2	Representação esquemática da citometria de fluxo.....	11
3	Representação esquemática do SAMBA 2005.....	26
4	Processo de binarização de imagem.....	27
5	Processo de numerização de imagem.....	28
6	Tipos de histogramas de DNA.....	33

RESUMO

A ocorrência do carcinoma de mama durante a gravidez e período puerperal representa um problema clínico polêmico sobretudo por sua infrequência e pelo prognóstico ruim que envolve. Nesta série de 36 casos de carcinoma de mama associado a gravidez colecionados em 30 anos e proveniente de três hospitais de Curitiba, 22 blocos de tumores conservados em parafina contendo amostras tumorais adequadas para análise de imagem dos núcleos foram corados por Feulgen e processados com SAMBA 2005 (TITN, França), foram determinados os parâmetros morfométricos e densitométricos bem como os parâmetros de textura, e comparados com 88 tumores provenientes de carcinoma de mama não coincidentes com gravidez. Análise comparativa monovariada mostrou diferença estatisticamente significantes nos parâmetros relacionados à área nuclear ($p < 0.001$) que mostrou núcleos maiores no câncer de mama associado a gravidez (CA+G) em relação ao câncer fora da gravidez (CA) e, houve uma maior incidência estatisticamente significativa ($p < 0.01$) de tumores aneuplóides no grupo (CA+G) também foi observado diferença estatisticamente significativa nos parâmetros que avaliam os pequenos e grandes agrupamentos de cromatina. Em análise multivariada os tumores do grupo (CA+G) quando divididos em primeira e segunda metade da gravidez também apresentam diferenças de textura, e também alterações densitométricas e de área nuclear. Os resultados são discutidos com paralelismo encontrado em análise de imagem nos tumores hormonodependentes.

ABSTRACT

Breast cancer presenting during pregnancy or puerperium is a polemical problem that is further compounded by its infrequent occurrence and unfavorable prognosis involved. In this serie with 36 cases came from breast cancer patients associated with pregnancy in 30 years colected from 3 hospital of Curitiba, the nuclei from 22 parafin embeeded tissues were stained by Feulgen and image analyses were performed with a SAMBA 2005 (TITN France) microscopic image processor. The morphometric, densitometric and chromatin pattern were compared with 88 cases of breast cancer from non pregnant patients. And one-way variance analysis shown in the nuclear área cells with bigger nuclei in patients with breast cancer and pregnancy (CA+G) tham the non pregnant patients with breast cancer (CA) ($p < 0.001$) as wel statiscaly significant differences were observed in chromatin pattern and densitometric parameters. In the multivariated analysis patients (CA+G) divided in first and second half of pregnancy shown statiscaly significant differences in nuclear area, densitometric parameters and cromatin pattern. The results were compared with those found in hormone related tumors.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 GENERALIDADES

O câncer da mama é a doença maligna mais comumente associada com a gravidez (BARNAVON, 1990; ROSEMOND & MAIER, 1988; HOOVER, 1991; DONEGAN, 1983; DONALD et al., 1988). Pouca evidência científica existe em relação ao tratamento mais apropriado da paciente grávida que apresenta câncer da mama, pois ainda apresenta um prognóstico particularmente sombrio. Esta opinião é sustentada por duas considerações teóricas: primeiro, as mudanças que ocorrem durante a gravidez tornam os nódulos mamários malignos menos evidentes e o diagnóstico se faz então mais tardiamente, comprometendo assim o seu prognóstico. (GALLEMBERG & LOPRINZI, 1989; KING et al., 1985; HOOVER, 1991; PARENTE et al., 1988; PETREK & REGATKO, 1991). A segunda seria que as alterações hormonais e imunológicas que ocorrem no meio hospedeiro durante a gravidez favorecem o crescimento do tumor e sua disseminação (ISHIDA et al., 1992; NUGENT & O'CONNEL, 1985; PARENTE et al., 1988; SUTTON, BUZDAR e HORTOBAGYI, 1990).

O câncer da mama é hormonodependente em uma fração significativa de pacientes, contudo, o efeito que as mudanças hormonais ocorridas durante a gravidez tem no curso da doença ainda é desconhecido (SUTTON, et al., 1990; Di SAIA, 1993), e inexistente informação convincente demonstrando que a gravidez per si apresente alguma influência adversa no prognóstico ou na biologia do câncer da mama (DONALD, et al., 1988). A complexidade da evolução clínica do carcinoma de mama durante a gravidez é amplamente reconhecida, mas seus determinantes permanecem praticamente desconhecidos. Como conseqüência, a determinação do prognóstico é sempre difícil, quer pelos fatores implicados no carcinoma de mama somente, quer pelos vários fatores associados à gravidez, (HOOVER, 1991; RIBEIRO & JONES, 1986; DOLL et al., 1989).

É bem sabido que vários critérios clínicos, morfológicos e hormonais são utilizados para estudar o carcinoma de mama: tamanho do tumor primário, comprometimento do revestimento cutâneo e ligamento de Cooper, comprometimento dos gânglios linfáticos de drenagem mamária, alguns tipos histológicos, diferentes graus de diferenciação tumoral e celular, pleomorfismo nuclear, invasão vascular por células tumorais e presença de receptores hormonais, (CHEVALIER et al., 1988; CONTESSO et al., 1987; DAVIS et al., 1985; HIETANEN et al., 1986; RUSSO et al.; THORPE . 1987).

Tais critérios são utilizados na tentativa de identificar pacientes de alto risco que apresentem recidivas mais precoces, metástases à distância e, conseqüentemente, encurtamento da sobrevida. Porém somente estas características não são suficientes para a análise preditiva do comportamento biológico do câncer da mama (TUBIANA, 1990; LARSIMONT, 1989 a; RUSSO et al., 1987).

Recentes avanços da biologia molecular ligados a um sistema lógico de informatização têm proporcionado dados científicos mais detalhados sobre o comportamento celular dos tumores malignos, acrescentando, desta forma, novos parâmetros para a avaliação mais precisa do prognóstico do câncer da mama.

Publicações recentes têm correlacionado estes parâmetros com menor sobrevida e intervalo livre de doença, a exemplo da citometria de fluxo e da análise de imagem (CLARK et al., 1989; LARSIMONT et al., 1989 b; KISS, 1987). Com isso pode-se dimensionar o conteúdo do DNA nuclear e a capacidade de proliferação da fase S e outros parâmetros texturais nucleares (KALLIONIEMI et al., 1988; KISS, 1987; LARSIMONT et al., 1989 a-b)

A correlação clínica do câncer da mama durante o ciclo gravídico e puerperal, como se viu, apresenta detalhes quanto à estratificação dos casos em: idade da paciente, idade gestacional, estadiamento da doença e número de gânglios comprometidos, tipo histológico e grau de diferenciação do tumor, tempo de evolução da doença, início de tratamento, modalidade terapêutica e ainda os vários critérios de respostas na avaliação de "cura" ou melhora da doença que não coincidem. Mesmo o critério de puerpério, de intervalo de um ano após o nascimento, não é padronizado em todos os artigos. Todos estes detalhes reunidos não estão presentes nas grandes séries, tornando o assunto sem conclusões.

Passa-se então às considerações mais técnicas relacionadas ao comportamento propriamente dito do tumor e à maneira de expressão do prognóstico, além das correlações clínicas.

1.2 CONSIDERAÇÕES BIOLÓGICAS DO CÂNCER DE MAMA NA GRAVIDEZ

Do ponto de vista anátomo patológico a frequência do espectro histopatológico do tumor mamário é similar na gravidez e fora da gravidez quando se analisa atendendo ao critério de idade BARRON, (1984). E, segundo DONEGAN, (1977); CLARK & REID, (1989) a incidência do carcinoma inflamatório também é igual para as pacientes grávidas e não grávidas com uma média de incidência da ordem de 1,5% a 4,0% de todos os carcinomas mamários.

Entretanto, do ponto de vista da biologia molecular seu comportamento relacionado ao receptor de estrogênio mostra resultados conflitantes. A pesquisa do receptor de estrogênio (RE) como valor de prognóstico e valor preditivo para a indicação de tratamento hormonal tem sido publicada em vasta série de artigos. Porém, poucas informações objetivas existem relativas ao estado hormonal do câncer de mama durante a gravidez. WALLACK et al., (1983) resumiram o resultado de 11 casos de carcinoma de mama e gravidez onde a dosagem do receptor de estrogênio foi dosado e mostrou que 7 dos 11 tumores analisados eram (RE) negativos, 1 era limítrofe e 2 fracamente positivos.

HOLDAWAY, et al., (1984) referiram em seu trabalho que ao dosarem o receptor de estrogênio (RE) e o receptor de progesterona (RP) em três pacientes grávidas e três pacientes lactantes com câncer de mama, observaram que o (RE) e o (RP) apresentavam dosagens negativas nas três pacientes grávidas, enquanto que nas três pacientes lactantes os (RE) eram positivos na ordem de 7, 18 e 65 fentomoles / miligramas de proteína tissular (fmols/mg prot)e o (RP) era positivo em duas pacientes na ordem de 19 e 68 (fmols/mg prot).

NUGET & O'CONNELL, (1985) encontraram em uma série de 14 pacientes com câncer de mama e gravidez em que as dosagens de (RE) em 10 pacientes (71% dos casos) eram negativos. Da mesma forma MAX & KLAMER, (1984) referem 3 em 4 pacientes com câncer de mama e gravidez serem (RE) negativo. Entretanto, GALLEBERG & LOPRINZI (1989), comentaram que a associação de carcinoma de mama e gravidez com (RE) negativo não é clara pois os altos níveis de estrogênio circulantes durante a gravidez estariam ligados a todos os receptores de estrogênio disponíveis, resultando em uma dosagem de receptor falso negativo que mede somente o

receptor não ligado. BUNKER & PETERS, (1963) não encontraram respostas objetivas no tratamento com ooforectomia em 32 mulheres que desenvolveram carcinoma de mama durante a gravidez, sugerindo desta forma que estes tumores eram realmente receptores hormonais negativos.

Recentemente, ELLEDGE et al., (1993), utilizando metodologia mais avançada na dosagem de receptores hormonais com processo imuno histoquímico de anticorpos monoclonais de ratos para receptores de estrogênio (D 75 P38) e receptor de progesterona (J Z B 39) que reconhecem o receptor de estrogênio ocupado e não ocupado, não encontraram diferenças estatísticas significantes de incidência entre (RE) e (RP) nos tumores de 15 pacientes com carcinoma de mama e gestação quando comparados com 411 pacientes não grávidas com carcinoma de mama tratadas no mesmo período. Este trabalho recebeu um suporte adicional da dosagem de supressores HER 2 / neu, em 7 das 15 pacientes examinadas, observando que estes 7 tumores apresentavam HER 2/neu várias vezes mais elevados do que os valores normalmente observados em pacientes não grávidas .

Baseados nos conceitos biológicos do crescimento tumoral acredita-se que as manifestações próprias do câncer durante a gravidez tem seu começo meses ou anos antes da concepção (HOOVER, 1991). Entretanto o retardo do diagnóstico parece ser a razão primária para o pior prognóstico que geralmente mostram todas as pacientes em que o câncer de mama foi diagnosticado durante o período de gravidez e lactação (ANDERSON, 1979; CANTER, 1973; CHEEK et al., 1973; HAAGENSEN et al., 1976; HOLLEB & FARROW, 1962; KILGORE, 1929; PETERS, 1962; RIBEIRO et al., 1977 e 1986; KING et al., 1985).

A mamografia freqüentemente não recomendada durante a gravidez por causa dos riscos de irradiação, também pouco contribui para o diagnóstico precoce devido às pobres imagens obtidas em tecidos densos e hiperplásicos da mama grávida. Observa-se como consequência deste retardo uma proporção de mais de 70% de pacientes com comprometimento ganglionar da axila no momento do diagnóstico contra 40% a 50% de comprometimento ganlionar da axila das pacientes com câncer de mama não grávidas (HOOVER, 1991).

1.3 PESQUISA DE NOVOS MARCADORES EM PATOLOGIA LIGADOS AO CÂNCER: GENERALIDADES

Certas formas de câncer já eram reconhecidas na medicina clássica. Por exemplo, Hipócrates dava uma descrição precisa e Galeno o descrevia pelo seu endurecimento, por sua fixação e pelas dores que causavam. Estas doenças foram consideradas durante séculos como derrame de humores orgânicos e somente no século XVII, com o desenvolvimento da anatomia patológica, percebeu-se que era resultado de um crescimento anárquico dos tecidos. Ao final do século passado, os avanços advindos do microscópio e das técnicas histológicas, permitiram diferenciar os tumores dos tecidos que os compunham. Foram estabelecidas as primeiras classificações morfológicas e uma nomenclatura ainda hoje utilizada. Estas foram mais recentemente aperfeiçoadas pelo estabelecimento de critérios que tentam separá-las em função de sua malignidade crescente (grading). Citamos como exemplo a classificação proposta por BLOOM & RICHARDSON, (1957) para os tumores de mama.

Como sublinham numerosas obras da história da medicina, foi ao redor do século passado que as primeiras teorias etiopatogênicas foram propostas. A título de informação assinalamos que JULES COHNHEIM, (1839-1884) sustentou a teoria do câncer a partir de restos embrionários isolados no indivíduo adulto. Virchow (1821 - 1902) atribuiu a origem de certos cânceres, a uma irritação crônica dos tecidos. Por sua vez, Charles Thiersch (1821 - 1895) considerou os tumores como sendo uma doença de natureza degenerativa. Atualmente, a pesquisa se interessa pela compreensão dos mecanismos subjacentes a gênese do(s) câncer(es), feito sobretudo através das técnicas de biologia molecular. A descoberta dos primeiros oncógenos datam do início dos anos 80 e deixam entrever, em um curto espaço de tempo, a possibilidade de efetuar uma ligação prodigiosa na compreensão da gênese dos cânceres. Atualmente, mais de cem oncógenos foram descobertos e é muito difícil, para a maior parte entre eles saber se se trata de "causa" ou "consequência" da neoplasia à qual estão associados (SCHULTZ & VANDE WOUDE, 1991). A situação é mais clara no que concerne aos "gênes supressores" RB e P53 que, desde que sejam alterados ou ausentes, permitiriam o desenvolvimento de diversos cânceres (HOLLINGSWORTH & LEE, 1991; LIVINGSTONE et al., 1992).

Este breve relato sobre a evolução dos conhecimentos ligados à gênese dos cânceres mostra que numerosas teorias foram elaboradas e, por vezes,

referiram terapias eficazes. Apesar da importante taxa de mortalidade que afeta esta doença, ela não deve ser considerada como incurável. Atualmente podemos obter uma remissão completa de certos cânceres com a condição de tratar os pacientes em um estadiamento precoce. É preciso que o patologista defina o mais rápido e exato possível a agressividade do câncer analisado a fim de aplicar a terapia mais apropriada.

A medida da ploidia tumoral foi proposta como critério objetivo da graduação de sua malignidade (ATKIN et al., 1979; BARLOGIE et al., 1983). Lembra-se, senso estrito, que a ploidia de uma célula define o número de vezes que o seu núcleo contém a quantidade de cromossomos **aplóide**, que é específico da espécie (23 cromossomos no homem). Os gametas são **aplóides**, a maior parte das células somáticas são **diplóides**, mas ao nos referirmos à quantidade de DNA que elas contém tornam-se **tetraplóides** na fase G2 da divisão celular. Em cancerologia a medida da taxa da ploidia é baseada na dosagem da quantidade de DNA contida em um núcleo euplóide normal. Uma população celular será dita **diplóide**, desde que o valor médio do conteúdo do núcleo seja próximo de **2c**, tendo em conta a existência de uma proporção de células **4c** em fase G2. Ela será **tetraplóide** para valores duplos, e **octaplóide** para os valores ainda dobrados. Como estes valores podem ser encontrados em tecidos normais qualificamos estas células de **euplóides**. Por outro lado, em tecidos tumorais benignos e malignos, podemos encontrar células **aneuplóides** em proporções variáveis. Estas células aneuplóides serão **triplóides**, ou seja, possuidoras de três pares de cromossomos ou quantidade **3c** de DNA, **pentaplóides**, possuidoras de cinco pares de cromossomos ou quantidade **5c** de DNA, etc. Tal qualificação dos núcleos celulares em termos de números de cromossomos ou de quantidade de DNA expressa em unidades arbitrárias, chama-se **medida da ploidia**, permitindo definir a **taxa de ploidia** de um tecido. Acredita-se que esta definição de ploidia pela taxa de DNA nada mais é do que uma aproximação daquela que está baseada sobre a quantidade de cromossomos normais, caso não se leve em conta a possibilidade de perda ou duplicação de um cromossomo isolado ou de uma parte do cromossomo. Deve-se todavia concordar que isto é de consenso, pelo uso sistemático, citado na literatura. Convencionou-se neste trabalho, que a "**ploidia**" é definida pela taxa de DNA segundo sua utilização na cancerologia.

Como se verá adiante, a citometria de fluxo, que é o método mais utilizado para a detecção da ploidia tumoral, não permite uma medida global do conteúdo médio de DNA sem detecção precisa das células de ploidia diferente e sem controle visual de cada célula.

A originalidade da técnica de citofotometria que se utilizou neste trabalho reside no fato de que permitem uma dosagem individual da quantidade de DNA contido em cada núcleo celular. Foi isto que chamou a atenção sobre a heterogeneidade dos tumores. Um bom número entre eles são constituídos de diversas populações celulares de ploidia diferentes (KRUCZYNSKI et al., 1992 ; JANNOT et al., 1993). A definição da heterogeneidade das estruturas é o principal progresso havido no estudo da morfologia celular. Isto apresenta vantagens que não podemos dispensar, com a condição de que ela não pretenda substituir os outros métodos de biologia celular, mas que venha trazer um complemento muitas vezes essencial. Constata-se que, durante a evolução de um tumor, a proporção de populações celulares de ploidia diferente muda, sugerindo que um tumor é constituído de vários clones que evoluem de maneira assíncronica (KRUCZYNSKI et al., 1992; JANNOT et al., 1993).

A Figura 1 estabelece a comparação aplicada à ploidia dos tumores. O tecido tumoral, esquematizado na parte inferior da figura, contém não somente núcleos " normais 2C " como o tecido normal donde provém, mas também de núcleos anormais. Convém sublinhar que um núcleo 2C no meio de um tumor, pode parecer normal em termos de quantidade de DNA mesmo que ele já possua anormalidades cromossômicas não detectáveis pelo método aqui utilizado. Na Figura 1 os núcleos normais (diplóides) estão simbolizados por um mesmo tipo gráfico de computador. Os "grandes" núcleos anormais (núcleos aneuplóides) são simbolizados pelos grandes ou pequenos símbolos. Em outros termos, uma mesma taxa de ploidia poderia conferir a um núcleo celular funções diferentes. Assim, o núcleo "5C-A" da Figura 1 pode corresponder a um núcleo perfeitamente funcional desde que "inteiro", ainda que o núcleo "5C- B" seja degenerativo. Um dos objetivos da presente tese é tentar discriminar as taxas de agressividade destes dois tipos de núcleos anormais; em outros termos, um tipo particular de núcleos anormais caracterizados por uma forma determinada de aneuploidia poderia conferir ao tumor propriedades degenerativas deste, o que melhoraria seu prognóstico.

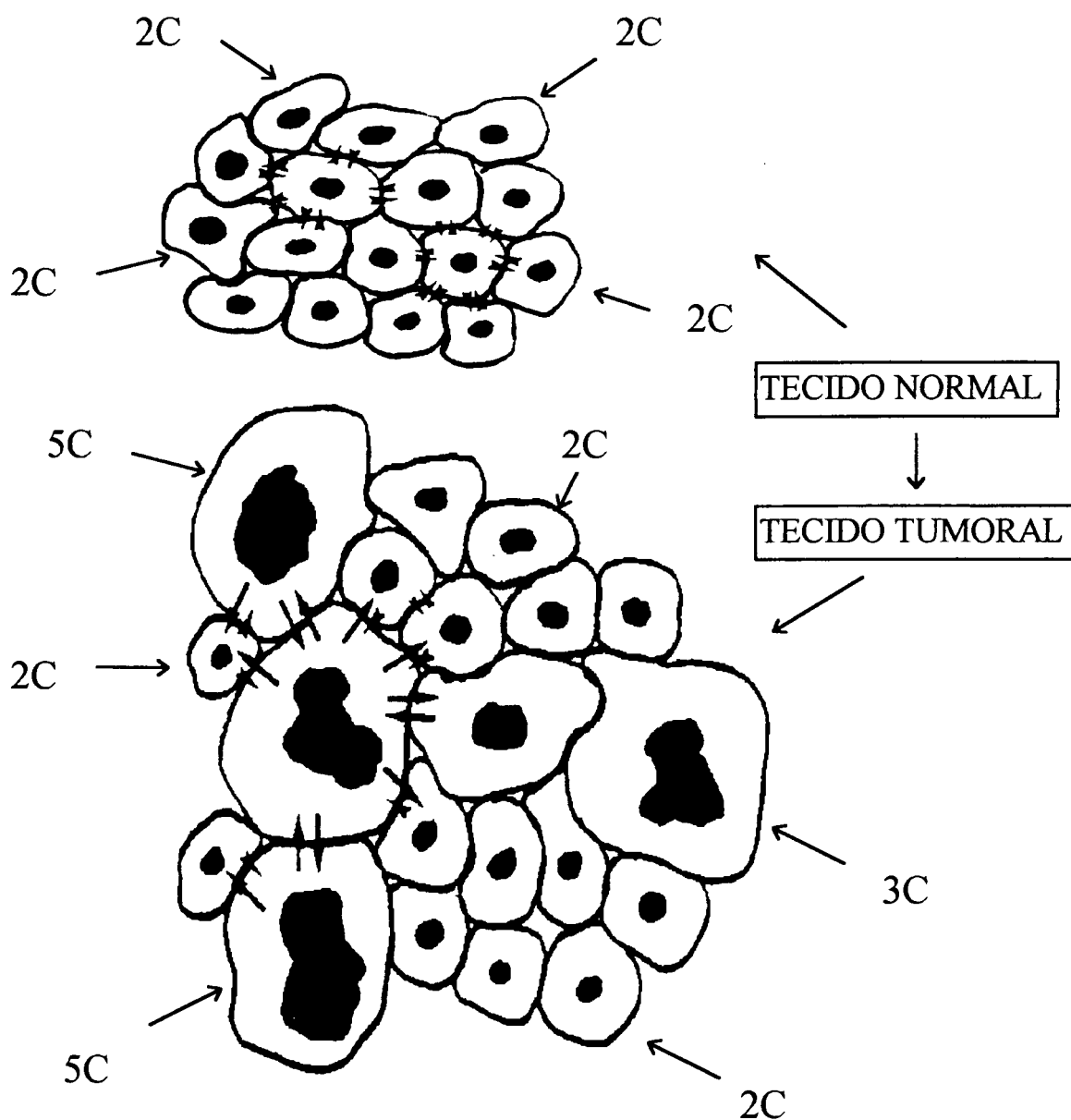


Figura 1: Representação simbólica da proliferação tumoral. Cada núcleo celular está representado simbolicamente pela sua ploidia. A figura superior representa um tecido normal constituído de células diploides (2C). A figura inferior representa um tecido tumoral constituído de células diploides (2C) e de células aneuploides (3C, 5C-A, 5C-B).

Estima-se que o arranjo destes "gens microprocessadores" que se traduzem por um desenho na cromatina possa igualmente trazer uma informação preciosa quanto ao grau de diferenciação ou de agressividade do câncer. Lembra-se que empiricamente as diferenciações histológicas dos tumores utilizam o aspecto da cromatina como critério, discriminando os grupos de prognósticos diferentes. Avalia-se tal parâmetro para caracterização da textura da cromatina

dos núcleos celulares corados segundo o método de FEULGEN & ROSENBECK, (1924). Enfim estima-se o volume no qual é fechado este "material informático" isto é, o tamanho do núcleo, também portador de informação preciosa. Processa-se então a cálculo da "**superfície nuclear**".

Duas técnicas são oferecidas hoje ao pesquisador para realizar este tipo de medida: a citometria de fluxo e a citofotometria. A primeira permite a análise de um número grande de células por uma dada amostra, a saber de algumas milhares a algumas dezenas de milhares, enquanto que a segunda se limita de algumas centenas a algumas milhares de células por amostra analisada. Por outro lado, a primeira tecnologia não permite controlar visualmente a amostra analisada, enquanto que a segunda o permite facilmente.

1.4 O UTENSÍLIO INFORMÁTICO E ESTATÍSTICO PARA A AJUDA DA CARACTERIZAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DO CÂNCER.

1.4.1 A citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi desenvolvida pelo engenheiro da IBM na metade dos anos 60 (KATMENTSKY, 1967). O princípio geral da citometria de fluxo está ilustrada na Figura 2. Este princípio consiste na incubação de células que tem uma forte afinidade pelo DNA, isto é, são dotadas de um mecanismo de ação tipo intercalante. As moléculas mais utilizadas são o brometo de etídio ou de um derivado da proflavine a acridina laranja. Estas moléculas são capazes de autofluorescência (MELAMED et al., 1991). Em outros termos, é necessário emitir um raio laser para se obter em retorno um raio fluorescente que pode ser medido por captadores apropriados. Assim estas moléculas intercalantes que vão se fixar de maneira estequiométrica, isto é, de maneira quantitativa sobre o DNA, vão oferecer após a excitação ao laser uma intensidade luminosa diretamente proporcional ao material absorvente, no presente caso, o DNA (MELAMED et al., 1991).

É de costume exprimir-se os resultados de modo relativo, isto é, em relação a um "standard diplóide externo" dos linfócitos humanos ou dos eritrócitos de galinha (MELAMED et al., 1991).

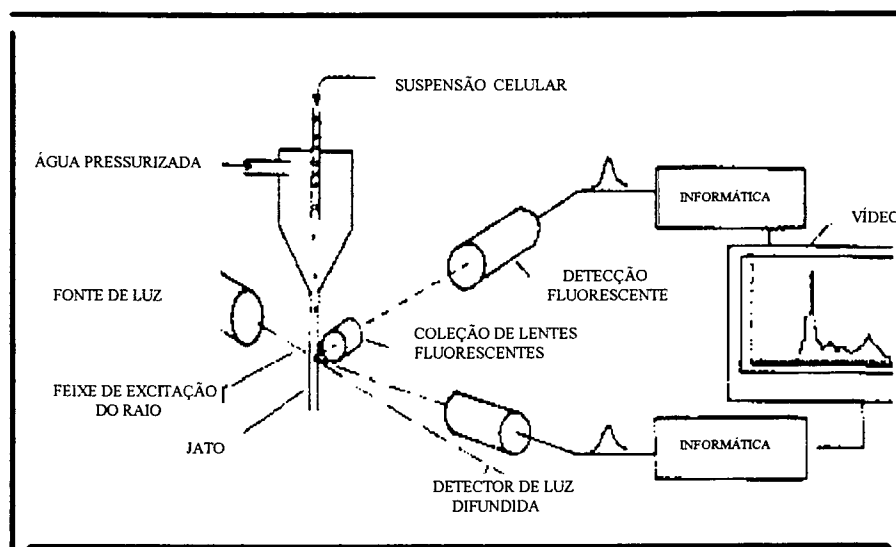


Figura 2: Representação esquemática da citometria de fluxo.

Myron Melamed, jovem patologista do Memorial Sloan-Kettering Câncer Center de Nova York, acreditou ser esta tecnologia, pilares importantes para o domínio da anátomo-patologia. Ele foi o primeiro a aplicar com sucesso esta tecnologia do futuro ao estudo da biologia das células vivas, normais ou patológicas (KATMENTSKY et al., 1965; KATMENTSKY & MELAMED, 1967; KOENIG et al., 1967).

HEDLEY et al., (1983) desenvolveram uma técnica que permite trabalhar sobre material de arquivo. Com isto pode-se estabelecer correlações precisas entre a taxa de ploidia de um tipo de câncer e sua agressividade; de fato sua técnica permite a utilização de forma retrospectiva do material histológico colecionado após vários anos no qual a evolução clínica dos pacientes são conhecidas *a posteriori*. Atualmente os estudos iniciados prospectivamente necessitam de correlação clínica durante vários anos.

Igualmente, os trabalhos da equipe de Barlogie definiram o "índice de DNA" no qual o DNA valia 1.00 unidade arbitrária no caso do tecido diplóide e, por definição, 2.00 unidades arbitrárias dentro do tecido tetraplóide (BARLOGIE et al., 1983). Este índice de DNA permanece hoje a unidade mais utilizada na literatura científica para se exprimir a taxa de ploidia de um tumor. Entretanto como se demonstra nos resultados, estas medidas representam apenas as "medidas médias" da quantidade do DNA no interior do tumor, induzindo por consequência um vício em relação a noção de "heterogeneidade celular" do

tumor, não está tão importante quanto a relação da agressividade de um tipo de câncer e a evolução clínica do paciente que fica em aguardo.

No início dos anos 80 os trabalhos dos grupos de pesquisa de Barlogie e Adreff estabeleceram a possibilidade de se utilizar um "impronte digital" de agressividade dos cânceres em termos de medida da sua taxa de ploidia (BARLOGIE et al., 1983). Com o recuo trazido após três décadas de pesquisa intensa após os trabalhos de Melamed neste campo, revelou-se que nenhuma regra absoluta poderia ser estabelecida entre a agressividade do câncer, ao senso global do termo, e a sua taxa de ploidia (AUER et al., 1989; KOSS et al., 1989; WIED et al., 1989). Ao contrário, por certas entidades anátomo-clínicas, tal relação pode ser demonstrada. Por exemplo foi claramente estabelecido que no caso do câncer de bexiga (TRIBUKAIT, 1987) do cólon e reto (CHANG et al., 1987; GIARETTI et al., 1991; KOURI et al., 1990) e do ovário (MILLER et al., 1991), a aneuploidia é acompanhada de um mau prognóstico. Inversamente, com relação aos neuroblastomas da criança, os tumores aneuplóides se mostram significativamente menos agressivos que os tumores euplóides e mais precisamente que os tumores diplóides (TAYLOR & LOCKER, 1990).

1.4.2 A citofotometria aplicada à coloração de Feulgen.

Foi a pesquisa conduzida de maneira intensiva em três domínios totalmente independentes que levou à criação e desenvolvimento dos analisadores de imagens modernos tais como o SAMBA (Alcatel - TITN, França) e o CAS (Becton - Dickinson, USA). Foram estudados com o domínio da informática, numerosos parâmetros na citofotometria com o auxílio da coloração de Feulgen.

Foram as pesquisas militares que conduziram à "descoberta" do computador e de suas aplicações tais como conhecemos hoje (LEPRINCE-RINGUET, 1991). De fato, von Newmann, por solicitação de Oppenheimer no laboratório de Los Álamos, foi o responsável pelo desenvolvimento de técnicas que permitissem fazer face aos cálculos colossais ligados a aventura da pesquisa atômica (von NEWMANN, 1957). Nascia então o primeiro computador.

Utilizou-se a informática em dois níveis desta pesquisa. No primeiro nível, no que se refere à transformação de imagens analógicas em imagens numéricas. No segundo nível, aplicou-se a informática ao tratamento matemático

dos dados (análise em componentes principais, transformação canônicas dos dados, análises discriminantes, etc.). A potência do computador que dispomos condiciona diretamente a precisão de nossas análises. A título de informação, quando as análises de imagem começaram, em 1988, trabalhava-se com um analisador de imagem equipado de um computador tipo "Victor AT/286". Hoje em 1994 estes mesmos analisadores de imagem são equipados de um computador tipo "Compac 486 " e os cálculos são feitos sobre uma "estação de trabalho" do tipo "SUN/SPARC", Isto significa, visto a memória "RAM" do Victor, que era simplesmente impossível calcular simultaneamente os 15 parâmetros morfonucleares (que serão colocados no presente trabalho) de um grupo de núcleos contendo mais de 1700 indivíduos. Porém, estes cálculos (tomando os componentes principais) consomem muito tempo. Hoje, para a execução dos cálculos de poder discriminante de 50 variáveis sobre um conjunto de núcleos celulares contendo mais de 100.000 indivíduos, apenas alguns minutos são necessários. Estes dados foram mencionados somente com o objetivo de chamar a atenção do leitor sobre o fato de que a forma como abordamos estes problemas estavam em parte condicionadas à qualidade de informação, associada ao analisador de imagens.

O segundo domínio que conduz ao nascimento da aplicação da citofotometria foi a coloração de Feulgen. De fato, foram Feulgen e Rossenbeck, que desenvolveram esta coloração em 1924. Hoje, após 70 anos da descoberta desta coloração, não existe ainda um protocolo perfeitamente estabelecido para sua realização. Podemos modificar a temperatura de hidrólise bem como a concentração dos reativos ou a qualidade dos corantes utilizados para os reativos de Schiff (GIROUD & MONTMASSON, 1989). Lembra-se que a cromatina apresenta regiões em que o grau de condensação pode ser muito variada no interior de um mesmo núcleo celular. Sendo assim, do ponto de vista morfológico, a cromatina de um núcleo celular pode se apresentar sob forma condensada (heterocromatina) ou não condensada (eucromatina). Como se pode questionar, a heterocromatina e a eucromatina representam os lugares de acessibilidade variável do reativo de Schiff após a hidrólise ácida, pois esta última age mais facilmente sobre a eucromatina do que sobre a heterocromatina (GIROUD & MONTMASSON, 1989). O mesmo tipo de problema aparece, referente a acessibilidade do núcleo à molécula do corante, em função da condensação da cromatina, quando se utiliza a citometria de fluxo (DRESSLER & BARTOW, 1989).

Enfim, o terceiro domínio é relativo à citometria de fluxo propriamente dita. Este terceiro aspecto da citometria é relativo aos dispositivos

que permitem armazenar as imagens. São fotomultiplicadores, os espelhos vibratórios que surgiram ao final dos anos 70 (BRUGAL et al., 1979). Atualmente, estes dispositivos de armazenamento correspondem a câmeras colocadas sobre as saídas "foto" dos microscópios.

Para este trabalho interessa somente um aspecto da análise informatizada de imagens, ou seja, dos núcleos celulares corados pelo método de Feulgen, restringiu-se a uma só aplicação quanto às definições seguintes. A citometria, é fundamentada sobre a medida, da quantidade de luz absorvida ou emitida, em cada ponto de um núcleo observado através de um microscópio. Integrando-se a medida por conjunto, de todos os pontos do núcleo e do fundo, sua imagem pode ser representada na forma de uma matriz numérica que será tratada pelo computador de acordo com as etapas seguintes:

- padronização dos parâmetros fotométricos;
- aquisição das imagens com ajuda de captadores;
- pré-tratamento da imagem que permita melhorar o contraste;
- a segmentação da imagem que permita selecionar, entre os pontos que a constituem, aqueles que pertencem a um núcleo a ser caracterizado;
- a parametrização da imagem que permite calcular, de cada núcleo, os parâmetros que caracterizam seu tamanho, sua densitometria e sua textura;
- o tratamento dos dados que permite extrair dentre os 15 parâmetros calculados sobre os núcleos de uma população celular, aqueles que apresentam uma variância estatisticamente significativa;

O analisador de imagens que foi utilizado é composto de um dispositivo de aquisição de imagens microscópicas e de dispositivos de tratamento destas imagens. O tipo de aparelhagem utilizada está descrito no capítulo Material e Métodos.

1.5 DESCRIÇÃO DE CERTOS PARÂMETROS CALCULADOS PELO COMPUTADOR QUE PODEM SERVIR DE MARCADORES DE AGRESSIVIDADE DOS TUMORES MALIGNOS.

1.5.1 Parâmetros ligados à morfologia do núcleo celular.

Existem numerosos parâmetros que descrevem a morfometria do núcleo celular. Pode-se, por exemplo, descrever a relação “perímetro ao

quadrado pela superfície” a qual, fornece um fator de "forma do núcleo" (BRUGAL et al., 1979) ou, medindo o seu "maior comprimento" (BAAK et al., 1982). Utilizou-se só um parâmetro para descrever a morfometria dos núcleos celulares. Tal parâmetro corresponde ao tamanho do núcleo. Este tamanho, por sua vez, corresponde à superfície (em número de "pontos-imagem" ou "pixels"), ocupada pela projeção do núcleo celular sobre a lâmina histológica (parâmetro NA). O cálculo deste parâmetro está detalhado no capítulo Material e Métodos.

Convém lembrar que este tipo de parâmetro foi utilizado com sucesso por diversos pesquisadores, para discriminar diversas patologias da mama (BAAK et al., 1982; LARSIMONT et al., 1989b) do cólon (AMBROS et al., 1990), da tireóide (LEE et al., 1987), da bexiga (DEPREZ et al., 1990) ou da próstata (BIBBO et al., 1990; PETEIN et al., 1990).

1.5.2 Os parâmetros ligados à densitometria do núcleo celular.

Por definição, considera-se como "densitométricos" somente os parâmetros que permitem avaliar a quantidade de DNA nuclear. São a densidade óptica integrada (DOI) e a densidade óptica média (DOM). Seu cálculo está descrito no capítulo Material e Métodos e mostra que o parâmetro DOI permite, igualmente, acesso ao cálculo da taxa de ploidia e à taxa de proliferação. O parâmetro DOI é equivalente ao parâmetro DI (DNA index), descrito pela primeira vez por BARLOGIE et al., (1983). Assim, é possível descrever o conteúdo de DNA dos núcleos tumorais de maneira "máquina-independente", ou seja, tanto pela linha de citometria de fluxo, que permite o cálculo do parâmetro DI, quanto pela linha da análise de imagem, que permite calcular o parâmetro DOI.

1.5.3 Os parâmetros ligados à textura, à organização, e à distribuição da cromatina do núcleo celular.

Como lembra Giroud em sua tese de doutorado,

... é importante notar que entre as particularidades reconhecidas nas células, pelos citologistas e anátomo-patologistas, numerosas são as que resultam de uma descrição detalhada de organização do núcleo celular, das diferentes entidades coloridas. O morfologista introduz assim, uma noção de textura nuclear que está associada ao estado funcional das células observadas. (GIROUD, 1987).

A definição dada por este autor, à vista da parametrização das faces da cromatina, é a seguinte: "a textura pode ser interpretada de modo geral como sendo a modelização do fenômeno de superfície organizada".

Dentre os 15 parâmetros morfonucleares utilizados no presente trabalho, 13 parâmetros descrevem as faces cromatinianas. Estes 13 parâmetros pertencem a três famílias distintas, a saber:

Parâmetros derivados de histograma de valores de densidades ópticas:

A título de exemplo, como descreve de LAUNOIT, (1989), o histograma de uma imagem é um importante revelador da textura de uma imagem. Desta forma, se esta apresenta somente um pico estreito, trata-se de uma imagem celular de fraca dinâmica, ou seja, pouco contrastada. Em outros termos, isto corresponderá a um núcleo que apresenta um aspecto relativamente homogêneo do ponto de vista de sua textura. Ao contrário, um histograma plurimodal sugere a existência de regiões de luminosidade diferente, correspondendo a um núcleo celular que apresenta uma face de cromatina heterogênea. Quatro parâmetros pertencem a esta primeira família: a densidade óptica média (DOM), variância da densidade óptica (VOD), o índice de Kurtosis (K) e o índice de Skewness (SK). Assim os parâmetros derivados do histograma de valores de densidades ópticas vão nos mostrar essencialmente o **aspecto homogêneo ou heterogêneo** do núcleo celular.

Parâmetros obtidos das matrizes de secção:

Define-se uma secção como um conjunto de pontos consecutivos, de nível de intensidades (ou de DOi) semelhantes em uma determinada direção. Estes parâmetros correspondem essencialmente à descrição da face da cromatina em termos de aparição do número de pequenos e de grandes agrupamentos de cromatina do núcleo. Esta segunda família comporta cinco parâmetros: a frequência do número de pequenos agrupamentos de cromatina (SRL), do número de grandes agrupamentos de cromatina (LRL), sua porcentagem (LRP) e a sua distribuição (RLD) relativas, e a distribuição de níveis de cinza do núcleo (GLD). Estes parâmetros foram descritos em detalhes por Galloway em 1975, e seu modo de cálculo figura no capítulo *Material e Métodos*. Estes parâmetros mostram principalmente o **aspecto granular** do núcleo (finamente agrupado, grosseiramente agrupado, etc.).

Parâmetros derivados das matrizes de co-ocorrência:

Quatro parâmetros texturais (descritos no capítulo Material e Métodos) pertencem a esta terceira família: a média local (LM), a energia (E), o coeficiente de variância (CV), dos valores obtidos da matriz de co-ocorrência, bem como o contraste (C). Estes quatro parâmetros mostram essencialmente o **grau de condensação** da cromatina tal qual ela aparece, nas presentes condições experimentais. Estes parâmetros foram descritos por HARALICK et al., (1973) e seu modo de cálculo figura no capítulo sobre Material e Métodos.

Sem entrar em detalhes, assinala-se que este tipo de análise da face da cromatina, permite a certos pesquisadores descrever os seguintes fenômenos. O estudo multiparamétrico da textura da cromatina permite, por exemplo, reconhecer as células epiteliais do colo do útero infectadas ou não pelo vírus do tipo HPV 16 e 18 (d'OLNE et al., 1989). No caso do câncer de mama, foi mostrado que o estudo da textura da cromatina dos núcleos provenientes de cânceres receptores estrogênicos positivos, diferiam significativamente dos receptores estrogênio negativos (LARSIMONT et al., 1989a). Este tipo de análise igualmente permite distinguir os tumores carcinóides atípicos de pulmão, dos chamados tumores "de pequenas células" (LARSIMONT et al., 1989b). Enfim, a análise quantitativa da face de cromatina dos núcleos celulares submetidos à coloração de Feulgen, sugere fortemente que as displasias severas da próstata seriam de fato os carcinomas *in situ* (PETEIN et al., 1991).

1.6 OBJETIVO DO TRABALHO

A finalidade desta pesquisa é comparar os parâmetros morfométricos, densitométricos e variações da textura através da análise de imagem com SAMBA 2005 (TITN - França) dos núcleos tumorais corados com Feulgen no câncer da mama que ocorre durante o período gravídico e puerperal e fora dele.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

KILGORE, (1929) mostrou dentro da sua casuística de 36 casos de carcinoma de mama e gravidez, um índice de sobrevida da ordem de 70 % em intervalo de tempo de 5 anos nas pacientes que apresentavam linfonodos negativos e de 11,7% em intervalo de 5 anos nas pacientes com linfonodos axilares comprometidos.

HARRINGTON, (1937) revisando um grupo de 88 pacientes grávidas ou lactantes com câncer de mama concomitante, observado em um período entre 1910 a 1933, verificou que a taxa de sobrevida destas pacientes em intervalo de 5 anos foi de 5,7%. Entretanto, referiu que este mesmo índice de sobrevida subia para 61% quando analisava isoladamente as pacientes que apresentavam axilas negativas por ocasião do tratamento cirúrgico.

HAAGENSEN & STOUT, (1943) analisaram o resultado do tratamento de mastectomia radical em 20 pacientes com câncer de mama e gravidez e observaram que nenhuma foi curada. Acharam o resultado tão desencorajador que concluíram não mais se justificar o tratamento cirúrgico de mastectomia em pacientes com câncer de mama e gravidez. Entretanto, nesta casuística apenas uma paciente entre todas tratadas apresentava axila negativa. Apenas mais tarde, revisando 48 casos vistos entre 1915 e 1950, os autores puderam refazer sua decisão anterior de mastectomia na gravidez, pois encontraram nesta casuística, um intervalo de sobrevida de 5 anos entre 32% das pacientes.

WHITE, (1955) sugeriu em seu trabalho que o estágio da gravidez durante o qual o câncer da mama foi diagnosticado e tratado apresenta influência sobre o prognóstico. Este autor observou que o tratamento, quando realizado durante o segundo ou terceiro trimestre, apresentava um índice de sobrevida, respectivamente de 8% e 10% e, quando comparado com as pacientes tratadas no primeiro trimestre (ou durante a lactação) este índice era da ordem de 16%. Atribuiu este resultado ao grande número de pacientes que se apresentavam com doença avançada durante a gravidez.

WHITE & WHITE, (1956) apresentaram o trabalho que do ponto de vista epidemiológico mostra um número mais expressivo. Referiam 1269 casos de câncer de mama e gravidez numa revisão da literatura (sendo que, destes casos, 60 são de sua casuística pessoal). Em revisão global de 45.881 casos de carcinoma de mama, mostram que a incidência foi de 2,8%. De 300.860 gravidez revistas, observaram apenas 93 casos documentados de câncer intercorrente, perfazendo um total de 3 casos de câncer de mama para cada 10.000 gravidez.

TREVES & HOLLEB, (1958) apresentaram uma casuística de 549 casos em pacientes mais jovens do que 35 anos que apresentavam câncer de mama. Entre estas, 78 estavam grávidas no momento do diagnóstico e 77% apresentavam comprometimento dos gânglios axilares, enquanto que nas não grávidas, 59% apresentavam comprometimento axilar. Quando o índice de sobrevida de 5 anos foi comparado entre os dois grupos, observou-se que as pacientes grávidas sobreviveram em 20% e as pacientes não grávidas sobreviveram em 21%; dados não significativos estatisticamente entre si.

PETERS & MEAKIN, (1965) encontraram um baixo índice de sobrevida em 5 anos quando compararam 60 pacientes grávidas com câncer de mama com um grupo de 1992 mulheres premenopausadas e com câncer de mama. A sobrevida de 5 e 10 anos foram de 38% e 24% respectivamente no grupo de pacientes grávidas. Encontraram um percentual de sobrevida de 6% em intervalo de 5 anos nas pacientes tratadas na última metade da gravidez. Quando comparado às pacientes não grávidas, este mesmo índice de sobrevida era de 39%. Encontraram ainda 49% de sobrevida em 5 anos para as pacientes observadas durante a última metade da gravidez e período puerperal. Este estudo apresenta estratificação semelhante para idade das pacientes e estadiamento da doença .

HAAGENSEN & STOUT, (1967) observaram índice de sobrevida de 12% em intervalo de tempo de 10 anos nas pacientes com câncer de mama e gravidez, no grupo de pacientes que apresentavam axila negativa; compararam com as pacientes não grávidas tratadas em mesmo período com mesmo estadiamento e observaram que, durante intervalo de 10 anos, 70% sobreviveram. Porém, das pacientes com carcinoma de mama e gravidez que apresentavam gânglios axilares positivos, nenhuma sobreviveu 10 anos, enquanto que 18% das pacientes não grávidas com gânglios axilares positivos sobreviveram 10 anos.

HORSTEY, (1968) relacionou 67 casos de carcinoma de mama abaixo de 35 anos de idade. Entre elas, 7 estavam grávidas e 10 eram puérperas; 12 destas 17 pacientes tiveram suas mamas operadas e 8 pacientes apresentavam gânglios axilares positivos. Porém, todas as 12 pacientes sobreviveram 5 anos. Com estes dados o autor sugeria não haver desvantagem nesta associação do câncer de mama e gravidez ou lactação.

RIBEIRO, (1977) observou uma sobrevida similar para câncer de mama e gravidez de estadiamentos equivalentes entre si, quando tratadas

independentemente de sua idade gestacional (primeiro, segundo ou terceiro trimestre). Não encontrou justificativa para retardar o tratamento, mesmo no último trimestre de gravidez.

WALLACK et al., (1983) num trabalho de revisão da literatura inglesa numa série de 23 trabalhos compilados, observados entre 1937 e 1979, encontraram, em média, um período de sobrevida de 5 anos livre de doença de 30% a 100% em pacientes com gânglios axilares negativos. Neste mesmo grupo de pacientes, quando observados durante 10 anos de intervalo livre de doença, a média caía para 22% a 55 %. Para as pacientes com linfonodos axilares positivos, o intervalo de sobrevida livre de doença em 5 anos variou em média de 0% a 42% e, durante o intervalo de 10 anos livre de doença, a média variou de 0% a 22%.

NUGENT & O'CONNEL, (1985) propuseram que a importante influência na sobrevida não era efeito da gravidez mas da relativa pouca idade das pacientes grávidas. Eles referiram na sua casuística que, de 176 pacientes com menos de 40 anos de idade com câncer de mama tratadas entre 1970 e 1980, 11% delas tiveram câncer de mama diagnosticado durante a gravidez e apresentavam entre elas uma idade média de 32 anos. Nas pacientes grávidas, um estadiamento clínico mais avançado era observado no momento do diagnóstico, devido a dois possíveis fatores: ou a um tumor mais agressivo ou a um retardo do diagnóstico. Quando estas pacientes foram estratificadas por estadiamento e pela idade, observou-se que o índice de sobrevida global de 5 anos nas pacientes grávidas e pacientes não grávidas eram equivalentes a 57% e 56%, respectivamente. Quando as 176 pacientes abaixo de 40 anos de idade foram comparadas a um grupo de pacientes acima de 40 anos, também com câncer de mama, a sobrevida, em cada grupo, era de 55% e 75%, respectivamente ($P=0.002$); sugerindo com isso que a idade das pacientes apresentava maior importância na sobrevida do que o fato da gravidez em si.

KING & WELCCH, (1985) não encontraram diferenças entre o índice de sobrevida em 5 anos para as pacientes tratadas nos diferentes trimestres da gravidez quando comparou 63 pacientes grávidas com carcinoma de mama durante um período de 30 anos.

RIBEIRO & JONES, (1986) em uma série de 121 pacientes com carcinoma de mama e gravidez, encontraram uma sobrevida de 5 anos na ordem de 25% para as pacientes com linfonodos axilares positivos e de 79% para as pacientes com linfonodos axilares negativos. Porém, 72% das pacientes

apresentavam linfonodos positivos na época do tratamento, apresentando portanto uma taxa de sobrevida global de 37% em 5 anos.

PETREK & ROGATKO, (1991) publicaram um trabalho com 56 pacientes com câncer de mama e gravidez, em estadiamento clínico I, II, e III, observadas entre 1960 e 1980 e compararam com 166 pacientes com câncer de mama não grávidas tratadas em mesmo período. Com cuidados de estratificação pela idade e estadiamento, observaram a sobrevida livre de doença durante 5 e 10 anos e não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as pacientes grávidas e não grávidas.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado neste trabalho provém de três hospitais da cidade de Curitiba: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Hospital Evangélico de Curitiba, e Hospital Erasto Gaertner, respectivamente, dos serviços de ginecologia e oncologia e patologia.

Compreende uma série de 36 pacientes com carcinoma de mama e gravidez, que foram diagnosticados ou encaminhados a estes hospitais nos últimos 32 anos (1961 - 1993) e de 88 casos de câncer de mama de pacientes não grávidas nos últimos 8 anos (1986 - 1993). Os exames foram realizados à partir do material de arquivo de tecidos tumorais fixados e emblocados em parafina. Das 36 pacientes com câncer de mama e gravidez que foram selecionadas nos arquivos apenas 30 tinham seu tumor primitivo como material arquivado nos serviços de anátomo-patologia e, destes 30 blocos, 8 não apresentavam suficiente representatividade tumoral para serem processados, sendo que o número total de casos analisados para este trabalho foi de 22 casos de tumor de mama e gravidez e 88 casos de tumor de mama fora da gravidez, totalizando 110 casos.

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL

Para obtenção dos espécimes citológicos, a partir de amostras fixadas no formol e emblocadas em parafina, adaptou-se as técnicas descritas por HEDLEY et al., (1983).

3.2 OBSERVAÇÃO DA COLORAÇÃO POR UM ANALISADOR DE IMAGEM.

Utilizou-se o analisador de imagem como um espectrofotômetro, haja visto o interesse exclusivo na numerização de imagens nucleares coradas segundo o método de Feulgen. Este instrumento permite quantificar diretamente um sinal luminoso sobre as preparações citológicas, ou seja, sobre núcleos "inteiros", sem dever trabalhar bioquimicamente em proveta ou em tubos de ensaio. A análise de imagem aqui utilizada fundamenta-se nas leis de Beer e Lambert, aplicadas aos métodos microfotométricos em luz transmitida. Como lembra GIROUD, (1987) a absorção luminosa de um objeto resulta da interação entre fótons de um comprimento de onda definido e certas estruturas químicas ou grupamentos cromóforos da matéria atravessada por estes fótons. Esta interação entre fótons e grupamentos cromóforos provoca uma perda de energia destes

fótons, chamada absorção. As leis de Beer e Lambert são a base teórica das observações fotométricas e podem ser resumidas da seguinte forma:

$$\log \frac{I_0}{I} = -\log T = A = E = DO = k.c.l = \frac{k.m}{a}$$

onde:

- I_0 = intensidade incidente;
- I = intensidade emergente;
- k = coeficiente de absorção molar do cromóforo;
- c = concentração do cromóforo;
- l = largura do cromóforo atravessado pela luz;
- m = massa do cromóforo;
- a = superfície exposta à radiação.
- A = absorbância
- E = extinção
- DO = densidade óptica
- T = transmissão

A medida das intensidades I_0 e I permitem caracterizar o poder de absorção do objeto, que se exprime, seja pela transmissão (T), seja pela densidade óptica (DO), ainda chamada absorbância (A) ou extinção (E). A DO é diretamente proporcional a A do objeto. No presente trabalho, como se utilizou uma coloração específica e quantitativa de DNA, os valores da DO fornecidos pelo analisador de imagem, correspondem às quantidades de DNA nucleares (expressas em valores relativos em comparação a um valor padrão interno, como no caso de linfócitos, núcleos normais, etc.).

3.3 O EQUIPAMENTO DE ANÁLISE: O ANALISADOR DE IMAGENS.

Descrição física do analisador de imagens.

Os esquemas abaixo ilustram a organização geral dos sistemas utilizados, a saber, “Systèmes d'Analyses Microscopiques à Balayage Automatique” (SAMBA, Alcatel-TITN, Grenoble, França). O primeiro sistema sobre o qual se trabalhou foi o SAMBA 200. A informática e a eletrônica deste sistema datam do final dos anos 1970 (imagens descritas por $64 \times 64 = 4096$ pixels). O sistema mais atual sobre o qual foi realizada esta experiência é o SAMBA 2005 (Figura 3) onde a eletrônica e a informática datam da metade dos anos 1980 (imagens descritas de $512 \times 512 = 262.144$ pixels).

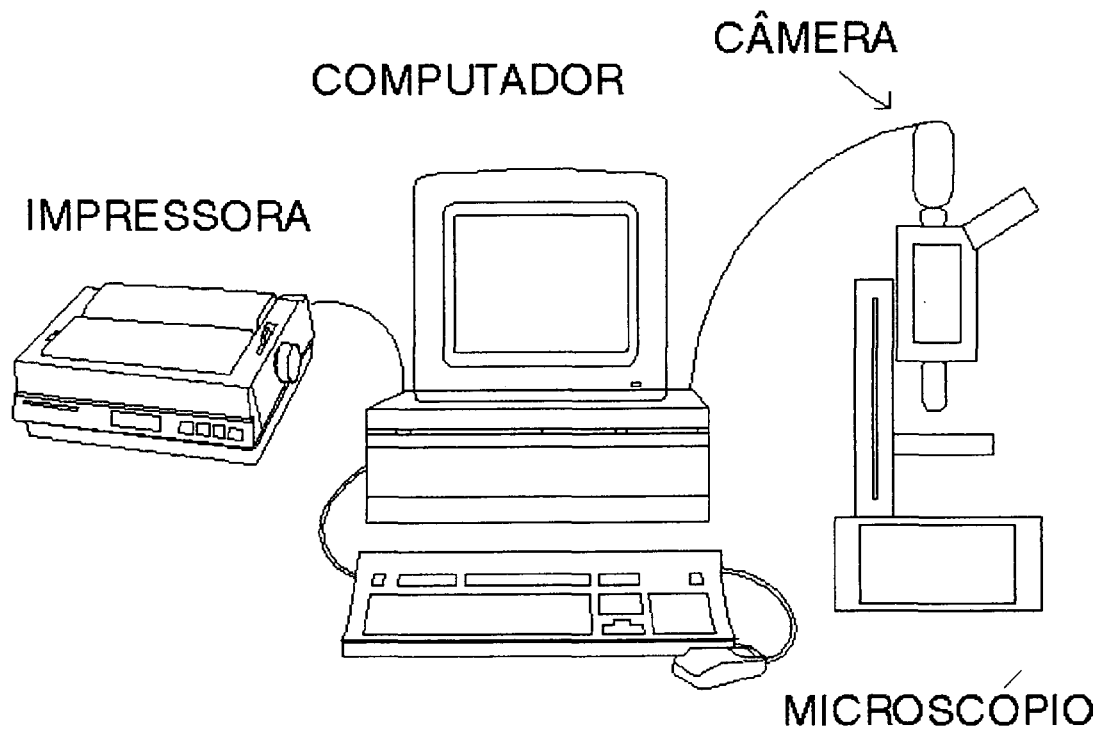


Figura 3 : Representação esquemática do SAMBA 2005. O fluxo luminoso é dividido em duas partes, uma parte visual (microscópio Leitz Diaplan) e outra parte da análise numerizada (câmera Sony CCD). As imagens captadas pela câmera são transferidas a um processador aritmético. Um sistema de interfaceamento entre o operador e o sistema é disponível para ajudar no desenvolvimento da análise.

3.4 PRINCÍPIO DE CAPTURA E SEGMENTAÇÃO DA IMAGEM.

Entende-se de maneira simples, que a imagem analógica tal qual ela é percebida pelo ser humano, é "transformada", com a ajuda de fotomultiplicadores ou de câmeras, em imagens numéricas que serão em seguida tratadas pelo computador. Esta etapa de transformação da imagem analógica em imagem numérica, consiste na **captura e armazenamento** da imagem. No processo de segmentação, inicialmente é feita captura em níveis de cinza e após é realizado a binarização de imagem que consiste em assinalar cada um dos "ponto-imagens" (pixel) da imagem, o valor binário 0 (branco) para o fundo, e o valor binário 1 (preto), para aquele que é diferente do fundo.

Neste caso, como ilustra a Figura 4, o fundo representa a lâmina histológica não corada pelo método de Feulgen, bem como, as imagens diferentes do fundo

"pálidas" (< 64), "pouco densas" (64-128), "moderadamente densas" (128-192) e "muito densas" (> 192). Todas as regiões do núcleo cujos valores numéricos são superiores a 192, poderiam por exemplo corresponder às "regiões hipercromáticas", definidas pelos morfologistas.

3.5 DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS CALCULADOS PELO COMPUTADOR.

a. A superfície do núcleo.

Corresponde à superfície de projeção do núcleo sobre a lâmina histológica, ou seja, ao número **n** de pixels que ocupa esta projeção sobre a lâmina histológica.

b. A densitometria do núcleo.

b.1. O cálculo da taxa de ploidia .

O cálculo da taxa de ploidia consiste em definir o conteúdo de DNA nuclear de uma dada célula e de exprimir em valor relativo, uma célula normal não proliferante (em fase G₀-G₁ do ciclo celular), contendo "quantidade 2c" de DNA, por definição. Neste caso, ou seja, desde que efetuamos uma análise citofotométrica de preparações celulares submetidas a coloração de Feulgen, a determinação da quantidade de DNA nuclear consiste em efetuar o cálculo da integral numérica sobre o conjunto dos valores numéricos (chamados também de densidade óptica, DO_i), descrevendo a densitometria de um dado núcleo. Assim, a quantidade de DNA nuclear, mede-se com a ajuda do parâmetro "Densidade Óptica Integrada" (DOI), cuja fórmula é a seguinte:

$$DOI = \sum_{i=1}^N DO_i$$

Onde DO é a densidade óptica

Esta integral efetuada sobre o conjunto de valores numéricos (DO_i) que descrevem um núcleo celular, exprime o conteúdo em DNA de um núcleo em unidades relativas de densidade óptica. Um núcleo diplóide que "contém" quantidade 2c de DNA, conterà **por definição** 2000 unidades relativas de densidade óptica (KISS et al., 1992). Vale lembrar que a quantidade de DNA

nuclear, por citometria de fluxo, exprime esta quantidade sob a forma de índice de DNA. Este índice de DNA (DI) vale 1,00 unidade relativa para um núcleo diplóide contendo quantidade $2c$ de DNA. O histograma de distribuição dos valores individuais da densidade óptica (DO_i) no centro de um núcleo, permite igualmente definir a lei de probabilidade da variável DO_i por meio da imagem nuclear numerizada. Como mostrou GIROUD, (1987) e de LAUNOIT et al., (1990) a forma de histograma revela bem a textura da imagem: se está presente só um pico estreito, trata-se de uma imagem qualificada de "fracamente dinâmica" que reflete um contraste fraco ao seio do núcleo. Em contrapartida, um histograma plurimodal, sugere a existência de regiões de diferentes luminosidades no seio do núcleo e por conseqüência, uma imagem nuclear contrastada. O histograma de distribuição dos valores de DO_i no seio de um núcleo celular não deve ser confundido com o histograma de distribuição dos valores de DOI no seio de **uma população de núcleos celulares** (conforme item b.2. a seguir).

A taxa de ploidia corresponde então ao valor médio de DOI calculado sobre uma população celular contendo no mínimo 200 núcleos (ver item b.2.). Esta taxa é expressa em unidades relativas de densidade óptica. Assim, uma população composta exclusivamente de células diplóides não proliferantes mostrará um valor de DOI igual a 2000 unidades relativas. Desta maneira, uma população puramente triplóide e não proliferante terá um valor de DOI igual a 3000 unidades relativas. Além do parâmetro DOI, quatro outros parâmetros são obtidos à partir do cálculo das densidades ópticas no seio de um núcleo, a saber:

1. A densidade óptica média (DOM) que representa o valor médio do conjunto das densidades ópticas pontuais dos núcleos, pode ser calculada pela fórmula:

$$DOM = \frac{\sum_{i=1}^N DO_i}{N} = \frac{DOI}{N}$$

2. A variância das densidades ópticas (VOD), é dada pela fórmula:

$$VOD = \frac{\sum_{i=1}^N DO_i^2}{N} - \left(\frac{\sum_{i=1}^N DO_i}{N} \right)^2 = \frac{\sum_{i=1}^N DO_i^2}{N} - (DOM)^2$$

Onde o parâmetro VOD mede a heterogeneidade da distribuição dos diferentes graus de condensação da cromatina qualquer que seja o grau de condensação da cromatina e sua organização (GIROUD, 1987; LARSIMONT et al., 1989; PETEIN et al., 1990).

3. Índice de Skewness (SK), ou coeficiente de assimetria que corresponde ao quociente momento da ordem 3 pelo desvio padrão (σ) elevado ao cubo, dado pela fórmula abaixo:

$$SK = \frac{\sum_{i=1}^N (DO_i - DOM)^3}{N \cdot \sigma^3}$$

Este coeficiente de assimetria do histograma é medido pela relação ao pico maior de densidade. Durante o ciclo celular uma diminuição dos valores de SK traduzem uma descondensação da cromatina (COLOMB et al., 1989; ETIEVAN et al., 1991).

4. O coeficiente de Curtose (K) que corresponde ao quociente do momento da ordem 4 pelo desvio padrão (σ) elevado à quarta potência.

$$K = \frac{\sum_{i=1}^N (DO_i - DOM)^4}{N \cdot \sigma^4}$$

O coeficiente K, ajuda na determinação do aplanamento do histograma, e mede a altura e a largura do pico maior do histograma de distribuição dos valores de DO_i. O valor de K aumenta com o aumento da altura do pico na medida em que sua base diminua: isto traduz um aumento da homogeneidade dos graus de condensação da cromatina.

b.2. A tipagem do histograma de DNA

O grupo de Bartels (WEBER et al., 1985, 1987) provou que bastava numerizar a imagem de 200 a 300 núcleos celulares para se obter um

histograma de DNA com perfeita resolução. Neste trabalho analisamos de 200 a 300 núcleos celulares para cada tumor.

Descrita de maneira original (SALMON, 1992) a forma de tipar o histograma do DNA, de maneira resumida mostra-se a forma que se procede: o histograma do DNA terá como nome etiquetado o valor da ploidia do pico G0-G1 da população celular que o compõe. No caso da população celular puras quanto ao seu conteúdo de DNA nuclear, reconhecemos 5 tipos de histogramas do DNA, a saber: os tipos **diplóide**, **hiperdiplóide**, **triplóide**, **hipertriplóide**, **tetraplóide**. Cada vez que se confrontou com populações celulares mistas em termos de taxa de ploidia, isto é, apresentando-se vários picos de G0-G1, classificou-se este histograma de **polimorfo** ou **aneuplóide**. Reconheceu-se assim neste estudo 6 tipos de histogramas do DNA, que são ilustrados na Figura 6.

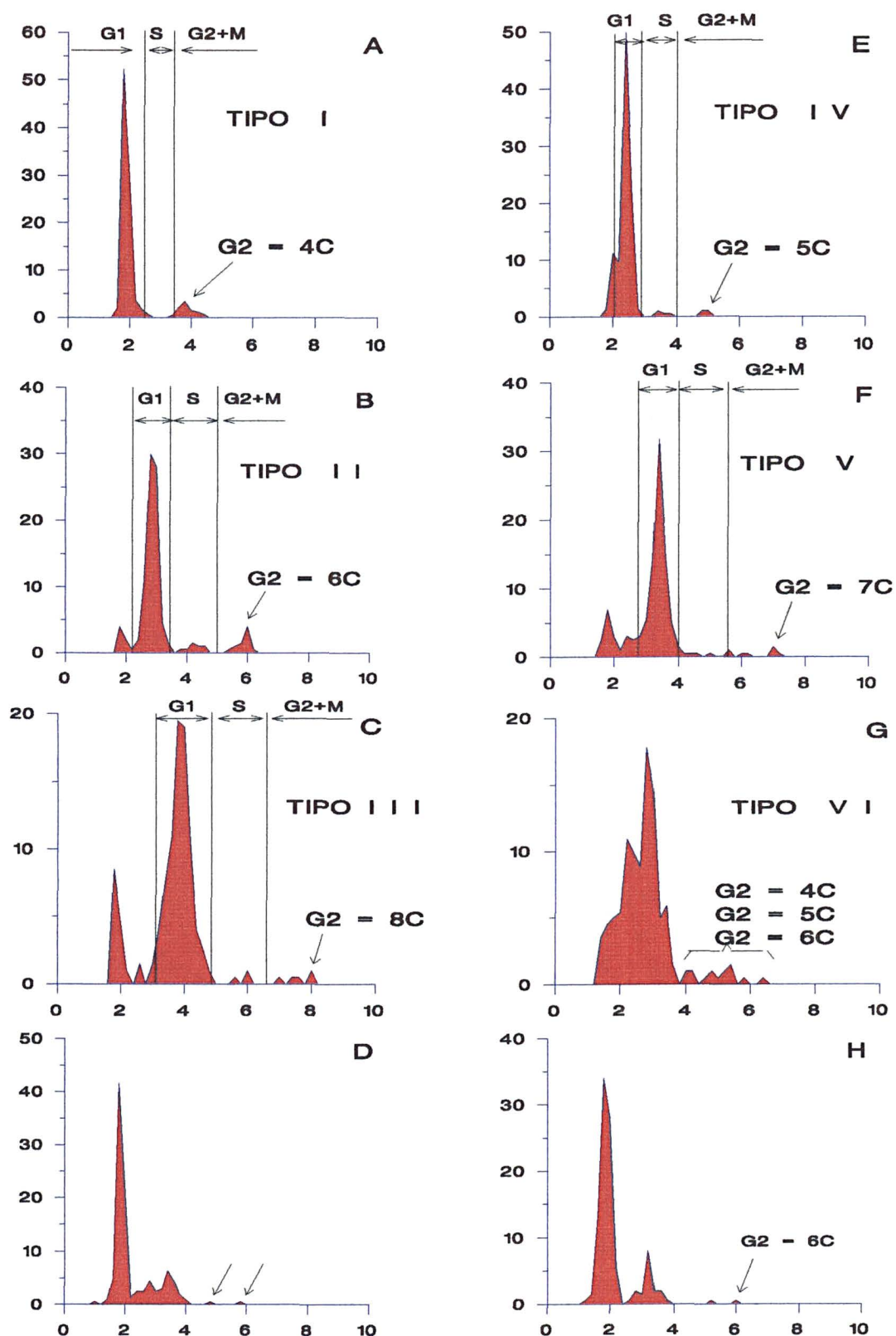


FIGURA 6: Esta figura ilustra 8 tipos de histogramas de DNA. Fig. 6A-DIPLOIDE, Fig. 6E-HIPERDIPLOIDE, Fig. 6B-TRIPLÓIDE, Fig. 6F-HIPERTRIPLÓIDE, Fig. 6C-TETRAPLOIDE, Fig. 6G-POLIMORFO. As Figs. 6D e 6H representam populações na maioria diplóides, mas possuem também populações minoritárias triplóides, sendo assim casos inclassificáveis. Os histogramas I a V possuem barras para separar as fases G0-G1, S e G2+M, do ciclo celular.

3.6 CÁLCULO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO.

A maneira pela qual foi calculado o índice de proliferação está ilustrado na figura 6. Este índice de proliferação corresponde à porcentagem de células engajadas na fase S do ciclo celular (OPFERMAN et al., 1987). De maneira prática, cada um dos histogramas representativos de uma dada população celular é definido de acordo com 50 classes de valores de densidades ópticas exprimidos em valores relativos (KISS et al., 1992). No caso de um histograma do tipo diplóide e hiperdiplóide, o índice de proliferação corresponde à porcentagem de células que se situam nas 5 classes que seguem o pico G0 - G1. No caso de um histograma do tipo triplóide e hipertriplóide, esta porcentagem é extraída das 6 classes que seguem o ciclo G0 - G1. Enfim no caso do histograma do tipo tetraplóide este índice é calculado sobre as 7 classes que seguem o pico G0 - G1.

Como ilustra a figura 6 não é possível calcular o índice de proliferação, levando em conta a presente metodologia sobre um histograma do tipo polimorfo porque os picos se sobrepõem. É preciso igualmente atentar-se a certas situações como ilustradas nas Figuras 6D e 6H. O histograma da Figura 6D poderia ser considerado, numa primeira abordagem, como um histograma do tipo diplóide com uma proporção importante de células engajadas na fase S. Porém no presente caso estas células que possuem ao redor de 3c quantidade de DNA estão em fase G0 - G1 triplóide como certifica a presença de um pequeno pico G2 + M hexaplóide. O mesmo se aplica os histograma representado na Figura 6H.

3.7 FACES DA CROMATINA

As faces da cromatina são descritas no presente trabalho pelos parâmetros pertencentes a duas famílias distintas a saber: os parâmetros obtidos a partir de matrizes de secção longa (GALLOWAY, 1975) e aquelas obtidas a partir de matrizes co-ocorrências (HARALICK et al., 1973). O detalhe de cálculo destes parâmetros são descritos no artigo de BRUGAL et al., (1979).

3.8 MATRIZES DE SECÇÃO LONGA

Define-se uma secção, como um conjunto de pontos consecutivos, de nível de intensidade (DOI) igual, em uma dada direção. A componente P (1,g) representa a frequência de ocorrência de secção longa 1 associadas ao nível de

intensidade g . A escala dos valores de comprimento estende-se de 0 à $L - 1$ e a escala dos níveis de intensidade de 0 à $G - 1$ (GARBAY, 1982). Podemos estudar as secções em uma só direcção ou nas 4 simultaneamente. As matrizes $P(l, g)$ permitem calcular um certo número de parâmetros que serão representativos da distribuição das secções da imagem em função dos dois parâmetros, comprimento e nível. No laboratório onde transcorreu o presente trabalho, o programa de computação utilizado com o analisador de imagem, permite calcular os comprimentos de secção que são estabelecidos, considerando-se a mesma dinâmica de níveis de intensidade (170 à 255). Esta escala de níveis de intensidade é igualmente reduzido em 16 níveis densitométricos. Cinco parâmetros representativos da distribuição das secções que compõem a matriz são calculados :

1. O parâmetro SRL (short run length emphasis) que representa a frequência das secções curtas, observadas ao seio da imagem numerizada do núcleo, é dado pela fórmula abaixo:

$$SRL = \frac{\sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G \left(\frac{P(l, g)}{l^2} \right)}{\sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G P(l, g)}$$

Este parâmetro é diretamente proporcional à probabilidade de encontrar secções curtas. Considera-se representativo da densidade dos pequenos agrupamentos de cromatina dentro do núcleo.

2. O parâmetro LRL (long run length emphasis) que representa a frequência das secções longas:

$$LRL = \frac{\sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G (l^2 \cdot P(l, g))}{\sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G P(l, g)}$$

Este parâmetro é representativo dos grandes agrupamentos de cromatina dentro do núcleo e fornece a presença de texturas grosseiras (longas secções).

3. O parâmetro RLP (run length percentage) que representa a porcentagem de comprimentos de secções:

$$\mathbf{RLP} = \sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G \left(\frac{\mathbf{P}(l, g)}{\mathbf{N}} \right)$$

Este parâmetro está correlacionado aos parâmetros SRL e LRL e representa o número de comprimento de secção por unidade de superfície. Este número é inversamente proporcional ao comprimento das secções.

4. O parâmetro GLD (gray level distribution) :

$$\mathbf{GLD} = \frac{\sum_{g=1}^G \left(\sum_{l=1}^L \mathbf{P}(l, g) \right)^2}{\sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G \mathbf{P}(l, g)}$$

A soma referente ao numerador representa o número de secções de nível g. O parâmetro GLD terá portanto um valor inversamente proporcional ao histograma de repartição dos comprimentos de secção e os diferentes níveis serão mais uniformes. Ao contrário, uma distribuição heterogênea dos comprimentos de secção traduzem um valor elevado de GLD. Desta forma o GLD mede a "não uniformidade" da distribuição dos níveis de intensidade na imagem nuclear numerizada:

5.O parâmetro RLD (run length distribution):

$$\text{RLD} = \frac{\sum_{l=1}^L \left(\sum_{g=1}^G P(l, g) \right)^2}{\sum_{l=1}^L \sum_{g=1}^G P(l, g)}$$

O RLD mede igualmente a não uniformidade da distribuição dos comprimentos de secção, tal qual o GLD, porém independente de seu nível de intensidade.

3.9 MATRIZES DE CO-OCORRÊNCIA

Sendo $P_{d,o}$ a matriz de co-ocorrência calculada sobre a imagem $A(i, j)$. Por definição $P_{d,o}(a, b)$ é a probabilidade para que dois pontos situados a uma distância (d) em uma direção (o) sejam um de nível (a) e outro de nível (b) . Pode-se calcular diversas matrizes correspondentes às distâncias e direções diferentes (GARBY, 1982). Estas matrizes de níveis de intensidade são estabelecidas considerando-se uma dinâmica dos níveis de intensidade arbitrariamente fixados de 170 à 275. Esta escala de níveis de intensidade é reduzida a 16 níveis densitométricos obtendo-se desta forma matrizes de dimensão 16 x 16. Quatro parâmetros representativos da distribuição pares componentes da matriz são assim calculados:

1. O parâmetro LM que representa a média local (local mean), pode ser calculado por:

$$\text{LM} = \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^i ((i + j) \cdot P(i, j))$$

Este parâmetro mede o nível de intensidade média do núcleo ou de uma de suas regiões especificamente escolhidas. Não é ligado às propriedades propriamente texturais, mas mede o grau global da condensação da cromatina. É inversamente correlacionado ao parâmetro DOM.

2. O parâmetro E (segundo momento ou Energia).

$$E = \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^i (P(i, j))^2$$

3. parâmetro CV (variâncias dos coeficientes da matriz):

Estes dois parâmetros são fortemente correlacionados por sua fórmula e traduzem a uniformidade da distribuição dos pares de pontos da matriz. Ao nível de imagem, traduz-se por uma uniformidade dos níveis de intensidade:

4. O parâmetro C (contraste):

$$C = \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^i (i - j)^2 \cdot P(i, j)$$

Este parâmetro mede a importância da fronteira entre as regiões nucleares de valores de intensidade diferentes. Ele aumenta em geral com o número de agrupamentos de cromatina densas e bem separadas. Entretanto ele possui um valor tanto mais elevado quanto maior a dinâmica real dos níveis de intensidade da imagem numerizada for mais larga.

3.10 DESCRIÇÃO SUMÁRIA DAS ANÁLISES MATEMÁTICAS E ESTATÍSTICAS.

3.10.1 Análise univariada.

Quando os resultados (apresentados sob a forma de média +/- seus erros padrões sobre a média), forem comparados entre si pelo teste de análise das variâncias a um critério de classificação por duas populações (DAGNELIE, 1975). Verificou-se as seguintes condições de aplicação:

- as amostras devem ser extraídas de maneira aleatória e independentes;
- as amostras devem ser divididas segundo uma distribuição normal: comparando-se a distribuição de cada amostra e a distribuição

teórica da normal, o teste do Chi quadrado permite verificar se elas não são estatisticamente diferentes. Se as condições de aplicabilidade deste teste não estão falsamente preenchidas por um número suficiente de graus de liberdade, é utilizado o teste de Kolmogorov - Smirnov, que é menos exigente;

- as variâncias devem ser iguais e duas possibilidades se apresentarão: ou as amostras são iguais, utilizando o teste de Hartley que divide as duas variâncias, ou as amostras são diferentes, neste caso o teste de Bartlett é utilizado, pois é mais simples.

Os resultados serão apresentados da maneira seguinte:

Não significativa = $p > 0.05$

Significativa = $p < 0.05$

Muito significativa = $p < 0.01$

Extremamente significativa = $p < 0.001$

Se estas condições não são encontradas, os testes não paramétricos menos exigentes, mas menos performantes de Kruskal - Wallis ou de Mann - Whitney são utilizados. Estes últimos classificam primeiramente as amostras pela disposição (classes) e após comparam as disposições de cada população (SIEGEL & CASTELMAN, 1988).

Todos os testes descritos acima foram realizados com o programa de informática CSS: STATISTICA (STATSOFT, INC., 1992).

3.10.2 Análise multivariada

As análises multivariadas são formadas de um conjunto de métodos estatísticos que tem por objetivo o estudo das relações existentes entre muitas variáveis dependentes e interdependentes (DAGNELIE, 1975). Entre o conjunto de análises possíveis foi utilizado a análise em componentes principais do tipo fatorial e análise discriminante. A análise em componentes principais tem por objetivo:

1. substituir as variáveis iniciais, geralmente correlacionadas entre elas pelas variáveis não correlacionadas;
2. reduzir o número de variáveis consideradas, isto é, o número de dimensões do espaço na qual as variações devem ser estudadas.

Seu objetivo principal é condensar o essencial de informações dado pelos 15 parâmetros morfonucleares interdependentes, observados diretamente, em um número mais restrito de variáveis que possa ser observado diretamente. Não será descrito em detalhes os cálculos matemáticos pertinentes à esta análise. Informa-se simplesmente que os cálculos são baseados sobre cálculos matriciais, considerando a matriz inicial de **a** indivíduos multiplicados por **b** variáveis, onde se obtém as matrizes de variância - covariância e as matrizes de correlação associada. Pesquisa-se em seguida os valores próprios que são as soluções de uma equação matricial a 15 graus. A estes valores numéricos próprios são associados seus respectivos vetores. Onde a justaposição constitui uma nova matriz que permite substituir as variáveis iniciais por variáveis não correlacionadas nas quais cada elemento será associado por uma função definida. Considera-se várias populações entre as quais existem diferenças de médias, encontra-se frequentemente o problema de disposição de uma o outra destas populações de indivíduos, e então à princípio não se sabe a qual população estes indivíduos pertencem (DAGNELIE, 1975).

O Soft DISCRI que foi utilizado permite classificar ou dispor os indivíduos dentro de uma ou outra das séries previamente definidas pelo emprego da análise discriminante. Esta análise tem por princípio definir duas populações em **N** variáveis, uma função linear **K** permitindo identificar à uma das duas populações, todo indivíduo caracterizado por um valor negativo de **K**, e da outra população, todo indivíduo caracterizado por um valor positivo de **K**, e isto de tal maneira que o risco de classificação errônea (classificação de um indivíduo pertencente a uma população dentro da outra população) sejam o menor possível. Esta função **F** é chamada de função discriminante. Como pela análise de variância a pesquisa da função discriminante se faz supondo-se que as duas populações possuem distribuições normais a **P** dimensões de mesmas variâncias e covariâncias, e que os parâmetros destas populações são conhecidos, pode-se estimar à partir de amostras suficientemente grandes. Dois tipos de análise discriminantes podem ser utilizadas: o método supervisionado (se impondo os parâmetros a considerar), e o método não supervisionado (sem impor os parâmetros). Os métodos de classificação geralmente utilizados no campo da análise de imagens citológicas são do tipo supervisionado. Estes métodos supervisionados necessitam uma etapa preliminar dita de aprendizagem pelo qual o lote de células utilizados foi previamente rotulado pelo investigador. Seguida esta etapa de aprendizado, os indivíduos desconhecidos serão classificados no tipo celular que lhes é mais semelhante (GIROUD, 1982).

O método não supervisionado não necessita condições prévias para as células a ser analisadas. Pode-se entretanto utilizar uma análise supervisionada chamada de “parcial”, onde seleciona-se previamente os parâmetros que assemelham-se diretamente a uma ou outra característica. Por exemplo a superfície nuclear (NA), que poderá estar ligada a um efeito citotóxico de um hormônio ou de uma droga, onde se esperava caracterizar o efeito.

Na análise discriminante os parâmetros são considerados etapa por etapa e classificados os mais discriminantes até os menos discriminantes, pela utilização dos testes de análise de variância. Os resultados obtidos por esta análise são apresentados sob a seguinte forma:

1. Lista por ordem decrescente dos parâmetros mais discriminantes.
2. Uma matriz de dupla entrada, a matriz de confusão, que apresenta para cada arquivo teste a porcentagem de núcleos reconhecidos em um **banco de dados** morfonucleares.

Desde que o valor associado ao poder discriminante de um vetor, seja superior a 6, a taxa de significância estatística associada ao poder discriminante é de $p < 0,05$; se for superior a 11, teremos $p < 0,01$; se superior a 30 teremos $p < 0,001$ e se superior a 60, teremos $p < 0,0001$. Estes valores podem ser obtidos pelos testes estatísticos de Fischer-Snedecor.

Os testes de correlação.

Entre todos os testes estatísticos baseados sobre as disposições (rang), o coeficiente de correlação r_s da ordem de disposição (rang) de Kendall foi utilizado neste trabalho para se evidenciar, eventuais correlações entre diferentes populações. Corresponde a uma medida de associação entre duas variáveis e requer o fato de que as duas variáveis sejam medidas de maneira ordinária de tal modo que os indivíduos do estudo possam ser arranjados em duas séries ordenadas (SIEGEL & CASTELMAN, 1988).

4.0 RESULTADOS

Os resultados são apresentados sob a forma de gráficos e representam a comparação entre tumores mamários relacionados ou não com a gravidez. Cada gráfico é auto explicativo e refere-se a cada um dos parâmetros onde foram encontrados resultados com significância estatística. Este parâmetros foram detalhadamente descritos no capítulo Material e Métodos.

RESULTADOS DA ANÁLISE MONOVARIADA ENTRE OS GRUPOS CÂNCER DE MAMA E GRAVIDEZ (CA+G) E CÂNCER DE MAMA FORA DO PERÍODO GRAVÍDICO-PUERPERAL (CA).

O Gráfico 1 apresenta as médias (representadas pelo ponto), +/- o erro padrão (representado pelas barras verticais) da área nuclear de ambos os grupos de estudo, e demonstra um aumento estatisticamente significativo ($p=0.029$) da média da área nuclear do grupo CA+G em comparação com o grupo CA. Ele expressa, no grupo de pacientes com câncer de mama e gravidez, a frequência de células tumorais com áreas nucleares relativamente maior ao grupo de tumores fora da gravidez .

O índice de Skewness (SK), também denominado de coeficiente de assimetria do histograma o qual é medido pelo maior pico de densidades, está apresentado no Gráfico 2 e demonstra inversamente ao grupo anterior, um decréscimo estatisticamente significativo ($p<0.001$) no grupo CA+G em relação ao grupo CA.

A frequência de curtas secções de cromatina (SRL), representado no Gráfico 3, mostrou ser a diferença entre o grupo CA+G com menores valores em relação ao grupo CA, estatisticamente significativo ($P<0.001$).

O fenômeno inverso foi observado na frequência de longas secções de cromatina (LRL), representado no Gráfico 4, ou seja, foi observado um aumento estatisticamente significativo ($p=0.006$) deste parâmetro no grupo CA+G em comparação ao grupo CA.

O parâmetro LM (condensação global da cromatina) representado no Gráfico 5, que mede o nível de densidade média dos núcleos, revelou um decréscimo estatisticamente significativo ($p<0.001$) no grupo CA+G em comparação ao grupo CA.

O Gráfico 6 apresenta o parâmetro contraste (C) o qual mede a importância das fronteiras entre as regiões nucleares de valores de densidades diferentes. Mostrou que existe significância estatística ($p < 0.001$) nos resultados havendo decréscimo no grupo CA+G em comparação ao grupo CA.

RESULTADOS DA ANÁLISE MULTIVARIADA ENTRE OS TUMORES DIAGNOSTICADOS NA PRIMEIRA METADE DA GESTAÇÃO (CA+G<20 SEMANAS) VERSUS A SEGUNDA METADE DA GESTAÇÃO (CA+G>20 SEMANAS).

Com o objetivo de averiguar possíveis diferenças dos tumores diagnosticados na primeira metade da gravidez versus a segunda metade do período gravídico ou no puerpério, foi realizada análise comparativa de 16 casos (de um total de 22 casos) na qual se pode precisar fielmente a idade gestacional da época em que a gestante realizou a biópsia.

Na análise monovariada não houve diferença estatisticamente significativa, quando comparados 6 tumores com diagnóstico até 20 semanas e 10 tumores com diagnóstico após as 20 primeiras semanas (2 tumores no puerpério). Utilizou-se o recurso da análise multivariada com a finalidade de estudar as relações existentes entre as variáveis dependentes e interdependentes. O objetivo principal é de condensar o essencial das informações dadas pelos 15 parâmetros morfonucleares calculados. A descrição desta análise está apresentada no capítulo Material e Métodos. Os Gráficos 7 a 14 ilustram como foi realizada um tratamento matemático para melhor caracterizar as células típicas de cada grupo, as quais estão representadas segundo as duas primeiras funções canônicas chamadas também de combinações lineares dos 15 parâmetros utilizados. Este tratamento canônico dos dados permite projetar num espaço bidimensional (plano fatorial) os resultados de análise multivariada figurando num espaço a 15 dimensões. As grandes elipses representam o intervalo de confiança de 95 % da distribuição celular fatorial, enquanto que as pequenas elipses representam um intervalo de confiança de 95% em torno da posição média desta distribuição celular fatorial. Cada elipse foi calculada com uma população celular de até 1713 núcleos (elipse B - Gráfico 7).

O Gráfico 7 apresenta esta primeira análise multivariada com transformação canônica. A elipse A representa a população nuclear tumoral das pacientes com câncer de mama diagnosticados até 20 semanas de gravidez (CA+G<20) e a elipse B, após as 20 semanas de gravidez (CA+G>20). Cada

ponto representa a posição espacial com transformação canônica da resultante dos 15 vetores (determinado pelos 15 parâmetros) de um núcleo estudado. Os pontos representados em pequenos quadrados azuis referem-se aos núcleos contidos na elipse **A** ($CA+G<20$), e os pequenos triângulos verdes, representam os núcleos contidos na elipse **B** ($CA+G>20$). Existe uma grande sobreposição das elipses, porém os resultados discriminatórios estatísticos mostram-se altamente significantes, como está representado pelos valores "**a:b**". O valor **a** (75) significa o nível de discriminação obtida após uma análise discriminante linear (valor em porcentagem). O valor **b** (208) significa o poder de discriminação do parâmetro mais discriminante. Este valor estatístico é obtido na Tabela Estatística de Fisher-Snedecor e, quando o valor **b** é maior que 6, corresponde a um nível de significância estatística de $p<0.05$, se **b** maior que 11, então $p<0.01$ se **b** maior que 30, então $p<0.001$ e se **b** maior que 60, então $p<0.0001$.

Havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos, porém havendo também grande parte de núcleos semelhantes coincidindo na região de sobreposição das elipses, pergunta-se quais seriam as características dos núcleos tumorais mais representativos de cada grupo, ou seja, os núcleos dispostos próximo à região central de cada elipse onde também existe a maior concentração nuclear, assim como os núcleos que mais se distanciam entre um grupo e outro (partes externas de cada elipse). Na tentativa de responder esta pergunta, optou-se pela utilização de um modelo matemático para "filtrar" cada distribuição celular fatorial. O soft CLUSTER (pertencente ao sistema SAMBA - TITN, France) determina uma linha para cada elipse, que separe o plano fatorial em 2 espaços, como apresentado no Gráfico 8. Definiu-se as áreas **EA** como sendo específica da elipse A, e **EB** como específica da elipse B, assim como **NEA** área não específica da elipse A e **NEB** como área não específica da elipse B. Os núcleos pertencentes às áreas não específicas serão eliminados da análise.

O Gráfico 9 apresenta uma nova análise multivariada com transformação canônica dos núcleos selecionados pela purificação matemática do Gráfico 8, sendo então as novas elipses denominadas de **C** (núcleos provenientes da área específica da elipse A) e **D** (núcleos provenientes da área específica da elipse B). Observa-se que os valores "**a:b**" são superiores aos mesmos valores apresentados entre as elipses **A** e **B**, representando um aumento do poder discriminatório entre as populações celulares. No entanto, ainda existe uma área de sobreposição das elipses **C** e **D**.

Procedeu-se nova purificação matemática semelhante à descrita anteriormente, na qual se separou a área **E** que é específica da elipse **C** e a área

F específica da elipse **D**, apresentadas no Gráfico 10. Estes novos grupos celulares selecionados foram submetidos a nova análise multivariada com transformação canônica e estão apresentados no Gráfico 11, onde existe uma pequena área de sobreposição das elipses **E** e **F**. Agora os valores "**a:b**" são ainda mais discriminantes (97:593) em comparação às análises anteriores, significando que se trata realmente de células particulares de cada grupo de estudo.

O Gráfico 12 apresenta a análise multivariada com transformação canônica das elipses **A**, **B**, **E** e **F**, ao mesmo tempo demonstrando que realmente a elipse **E** compreende os núcleos típicos da elipse **A**, assim como a elipse **F** compreende os núcleos típicos da elipse **B**. Para melhorar a compreensão gráfica foi exibida a mesma análise no Gráfico 13 apenas eliminando-se os pontos. O cálculo vetorial final dos parâmetros que mais contribuem para esta disposição espacial com transformação canônica das 4 elipses está representado no Gráfico 14. Quanto maior o vetor, mais potente foi este parâmetro para diferenciar as elipses entre si, considerando a direção em que está disposto este vetor.

Uma vez realizada a purificação matemática para selecionar os núcleos típicos de cada grupo de estudo (elipses **E** e **F**), os quais formam um "banco de dados" específicos de cada grupo, resta retomar a matemática monovariada para descrever quais são as diferenças existentes nos parâmetros mais discriminantes entre os grupos **CA+G<20** e **CA+G>20** (Gráficos 15 a 18). Em ordem decrescente segundo os valores estatísticos *F* de Fischer os quatro parâmetros mais discriminantes foram os parâmetros **SRL**, **DOI**, **NA** e **LM**. Estes resultados em forma de matemática monovariada podem agora ser comparados aos resultados já apresentados anteriormente dos grupos **CA+G** e **CA**. Assim, o Gráfico 15 apresenta os resultados referentes à área nuclear (**NA**) dos grupos **CA+G<20** e **CA+G>20** comparados aos resultados do Gráfico 1 (**CA+G** e **CA**).

Os resultados revelam que existe maior área nuclear estatisticamente significativa ($p<0.001$) nos tumores mamários gestacionais diagnosticados na primeira metade da gestação (**CA+G<20**), em comparação aos mesmos tumores diagnosticados na segunda metade da gestação (**CA+G>20**). Observa-se também que os tumores **CA+G<20** foram os que contribuíram para a diferença existente entre **CA+G** e **CA**, ou seja, os tumores de mama e gravidez analisados em um só grupo versus os tumores mamário fora do período gestacional.

Na sequência apresenta-se os resultados da densidade óptica integrada (**DOI**) no Gráfico 16, obedecendo-se a mesma estrutura do gráfico

anterior. Existe um aumento da densidade óptica integrada na segunda metade da gravidez estatisticamente significativa ($p < 0.001$), em comparação aos tumores da segunda metade do período gestacional. Não houve diferença estatística entre os grupos CA+G e CA, motivo pelo qual estes resultados não haviam sido apresentados na primeira parte deste capítulo.

Os Gráficos 17 e 18 apresentam, respectivamente, os resultados da frequência de curtas secções da cromatina (SRL) e da condensação global da cromatina (LM). Os resultados são semelhantes, isto é, em ambos os gráficos existe uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0.001$) dos valores dos parâmetros na primeira fase do período gravídico em comparação à segunda metade do mesmo. Os tumores CA+G<20 foram novamente, como no Gráfico 15, os tumores que mais contribuíram para a diferença existente entre os grupos CA+G e CA.

RESULTADOS DA CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES MAMÁRIOS SEGUNDO O TIPO DE HISTOGRAMA.

Conforme descrito no capítulo Material e Métodos a maneira de tipar o histograma de DNA, é mostrado de forma resumida na Tabela 1. No caso das populações celulares puras, quanto ao seu conteúdo de DNA nuclear, reconhecemos 5 tipos de histogramas e o 6º tipo como sendo polimorfo ou aneuplóide (várias populações celulares).

A Tabela 1 representa a ocorrência em valores absolutos e em porcentagem segundo os 6 tipos de histogramas durante e fora da gravidez. Não há resultados estatisticamente significantes quando comparados os tumores nos dois diferentes grupos (CA+G e CA).

A Tabela 2 apresenta os números absolutos e o cálculo em porcentagem dos tumores classificados em dois grupos, o primeiro refere-se aos tumores com histogramas tipos I, II, III, IV e V, e o segundo grupo aos tumores com histograma tipo VI. Houve uma maior ocorrência dos histogramas tipo VI no grupo de estudo CA+G (36%) em comparação ao grupo CA (11%), estatisticamente significativa ($p = 0.012$).

ÁREA NUCLEAR

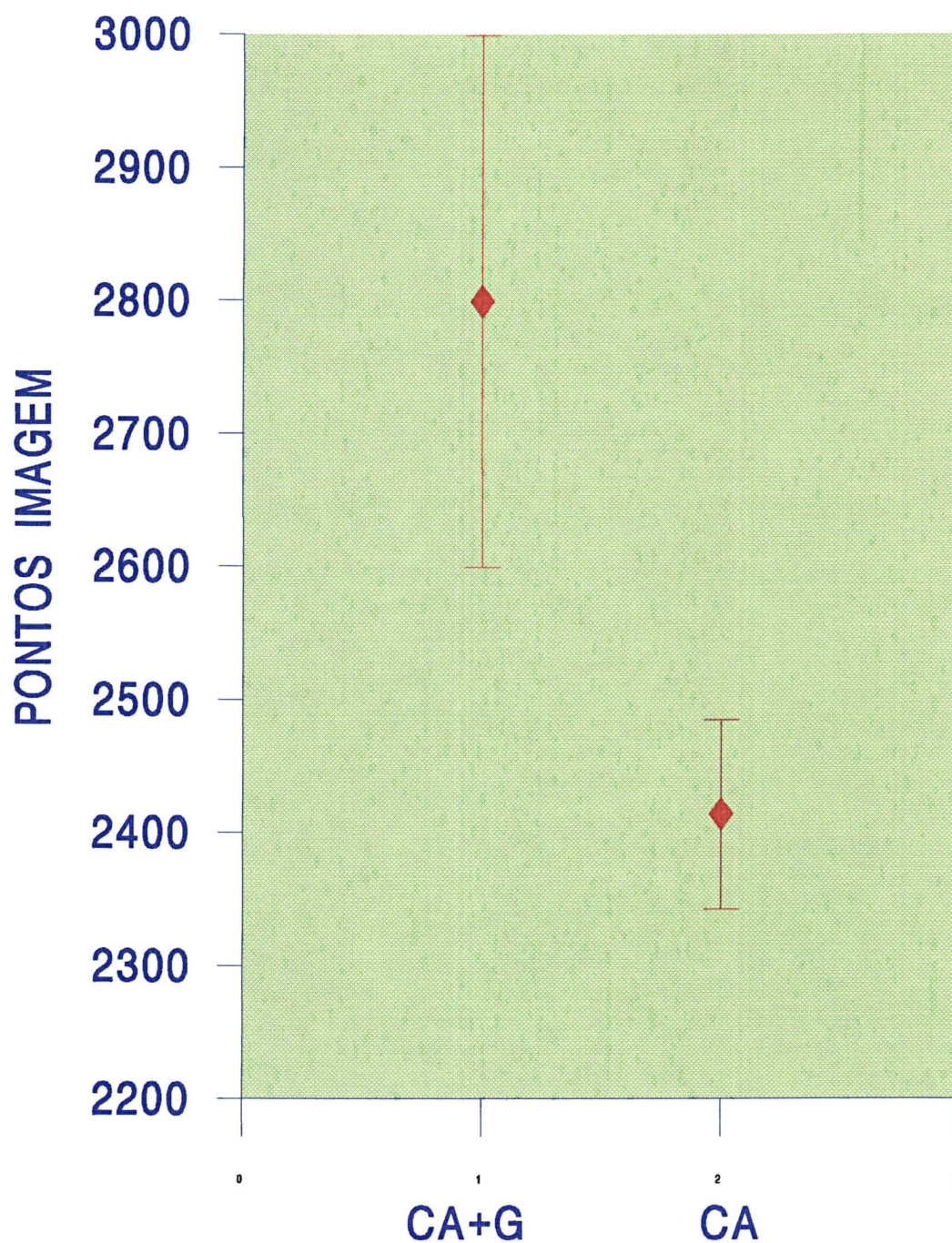


GRÁFICO 1: Representação gráfica da média (+/- erro padrão) da área nuclear dos grupos de estudo. CA = câncer de mama; G = gestação. (p=0.029)

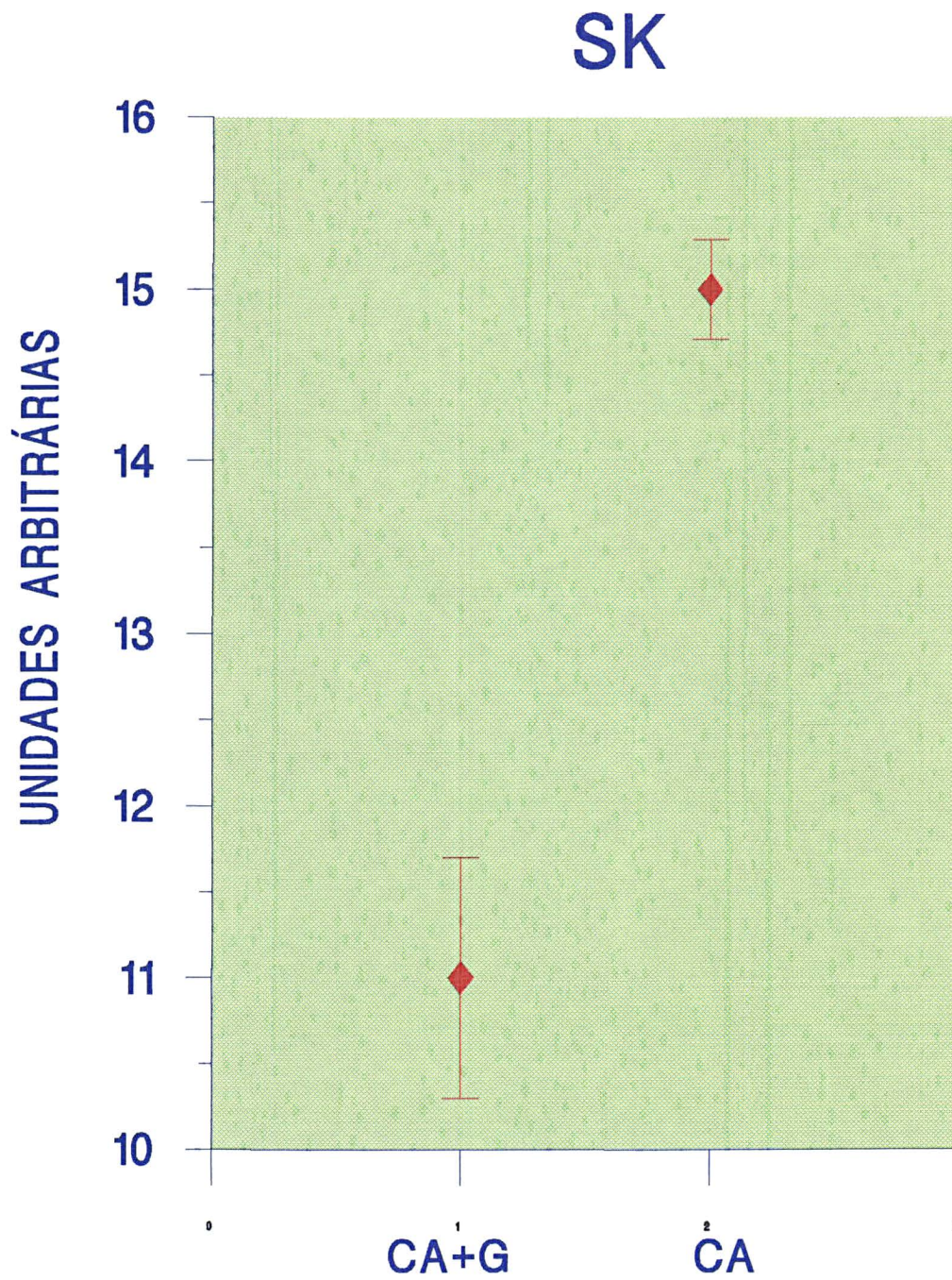


GRÁFICO 2: Representação gráfica da média (+/- erro padrão) do índice de "Skewness" (SK). CA = câncer de mama; G = gestação ($p < 0.001$)

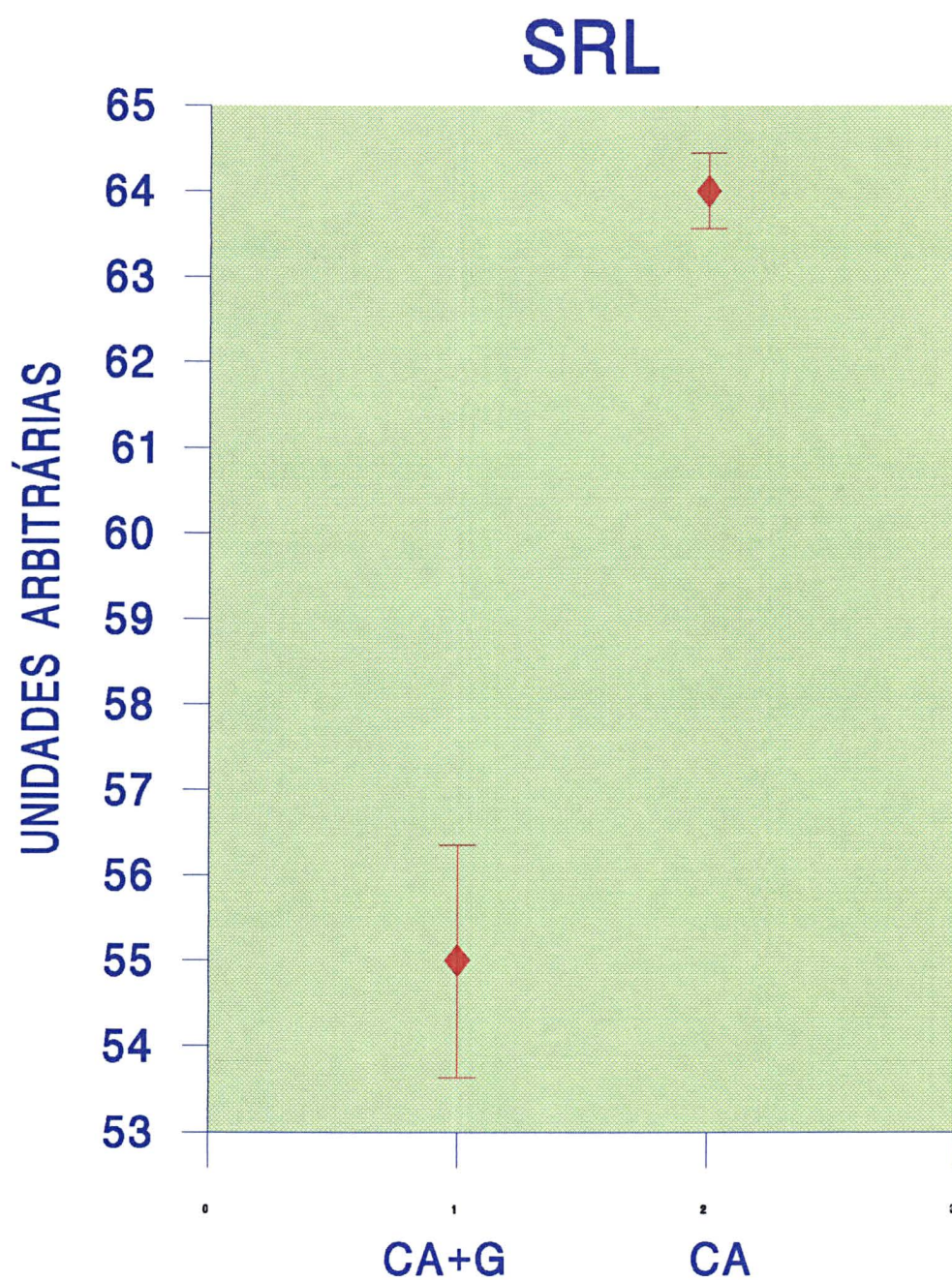


GRÁFICO 3: Representação gráfica da média (+/- erro padrão) da frequência de curtas secções de cromatina (SRL) nucleares. CA = cancer de mama; G = gestação ($p < 0.001$)

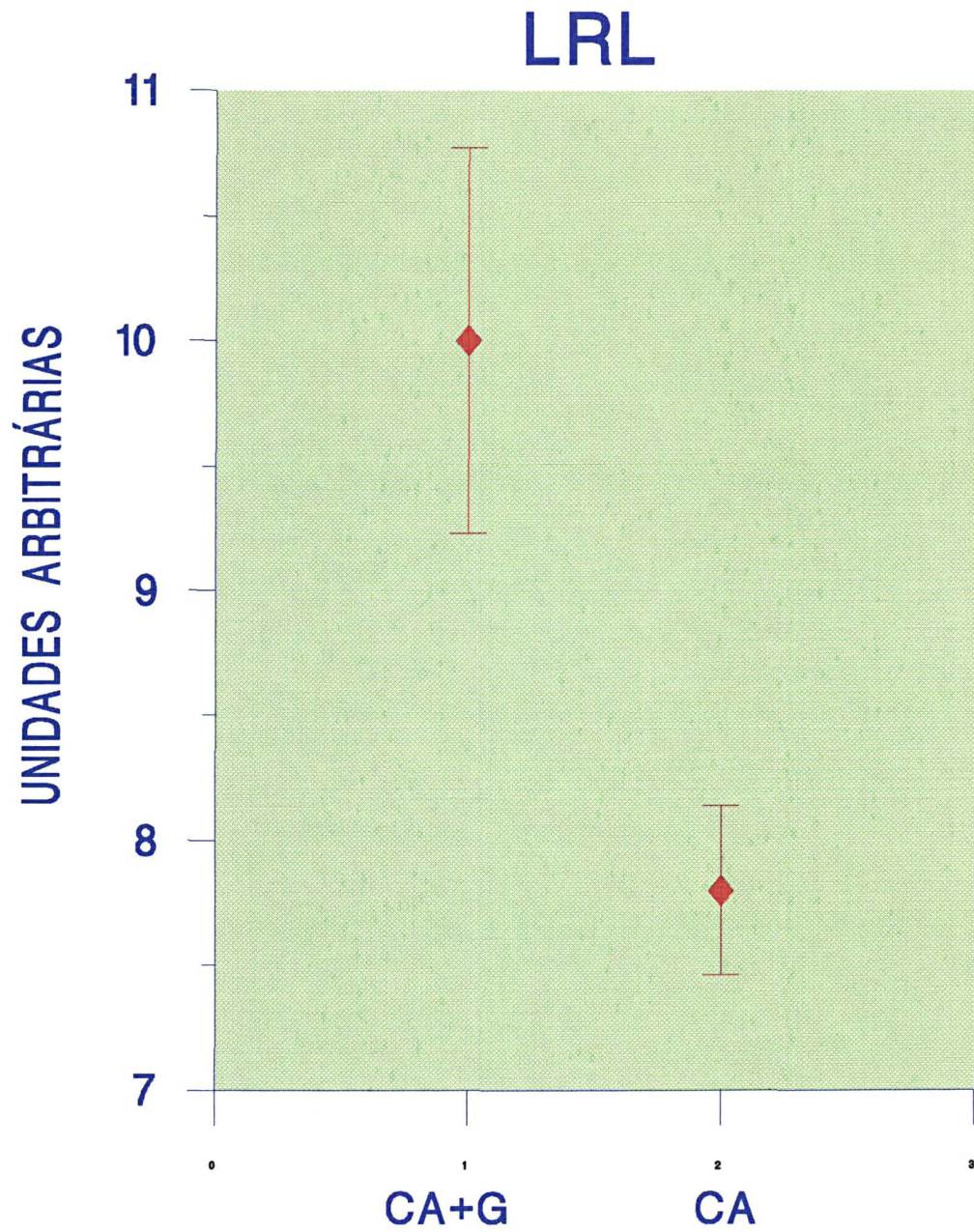


GRÁFICO 4: Representação gráfica da média (+/- erro padrão) da frequência de longas secções de cromatina (LRL) nucleares. CA = câncer de mama; G = gestação (p=0.006)

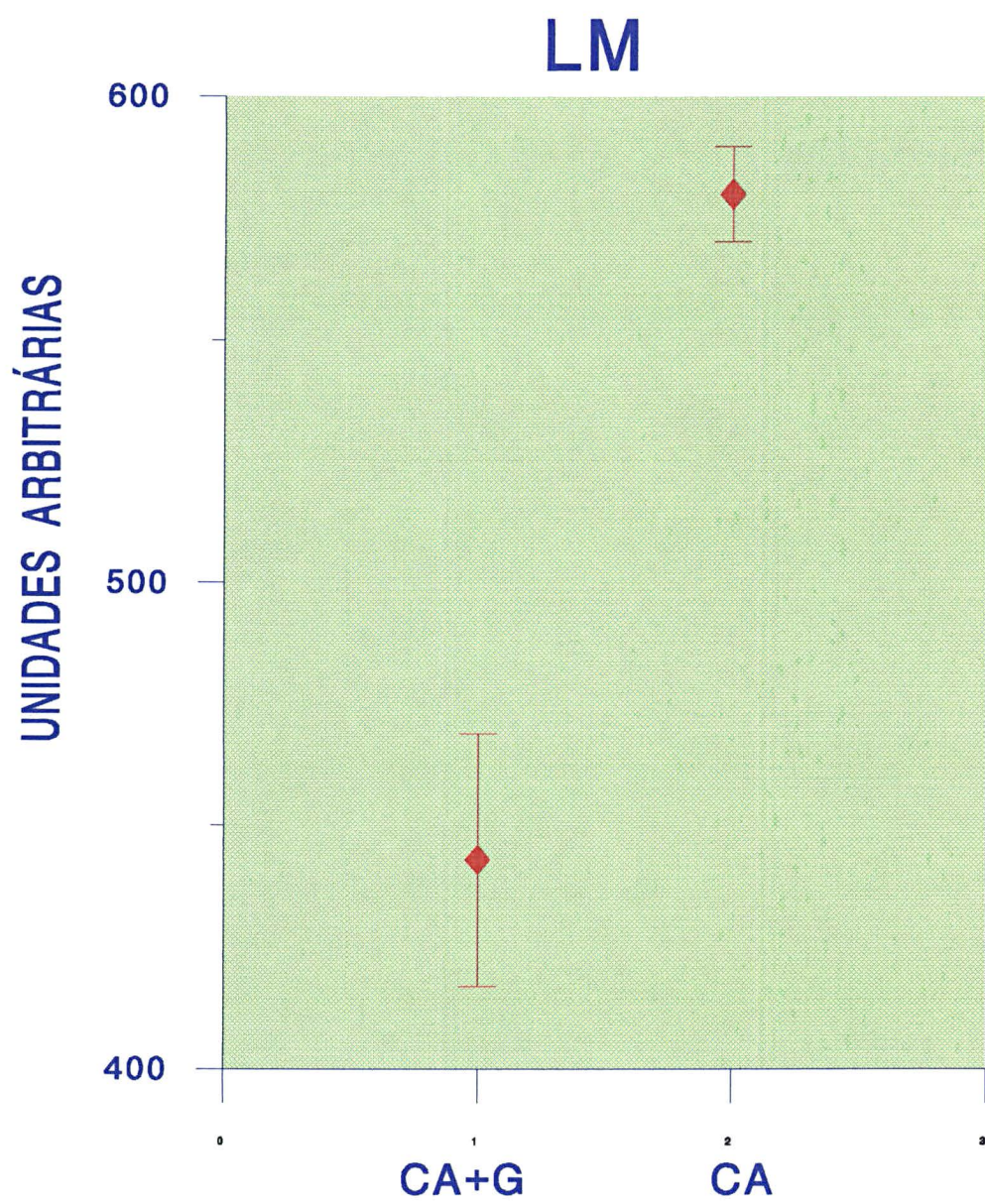


GRÁFICO 5: Representação gráfica da média (+/- erro padrão) do parâmetro "local mean" (LM). CA = câncer de mama; G = gestação (p<0.001).

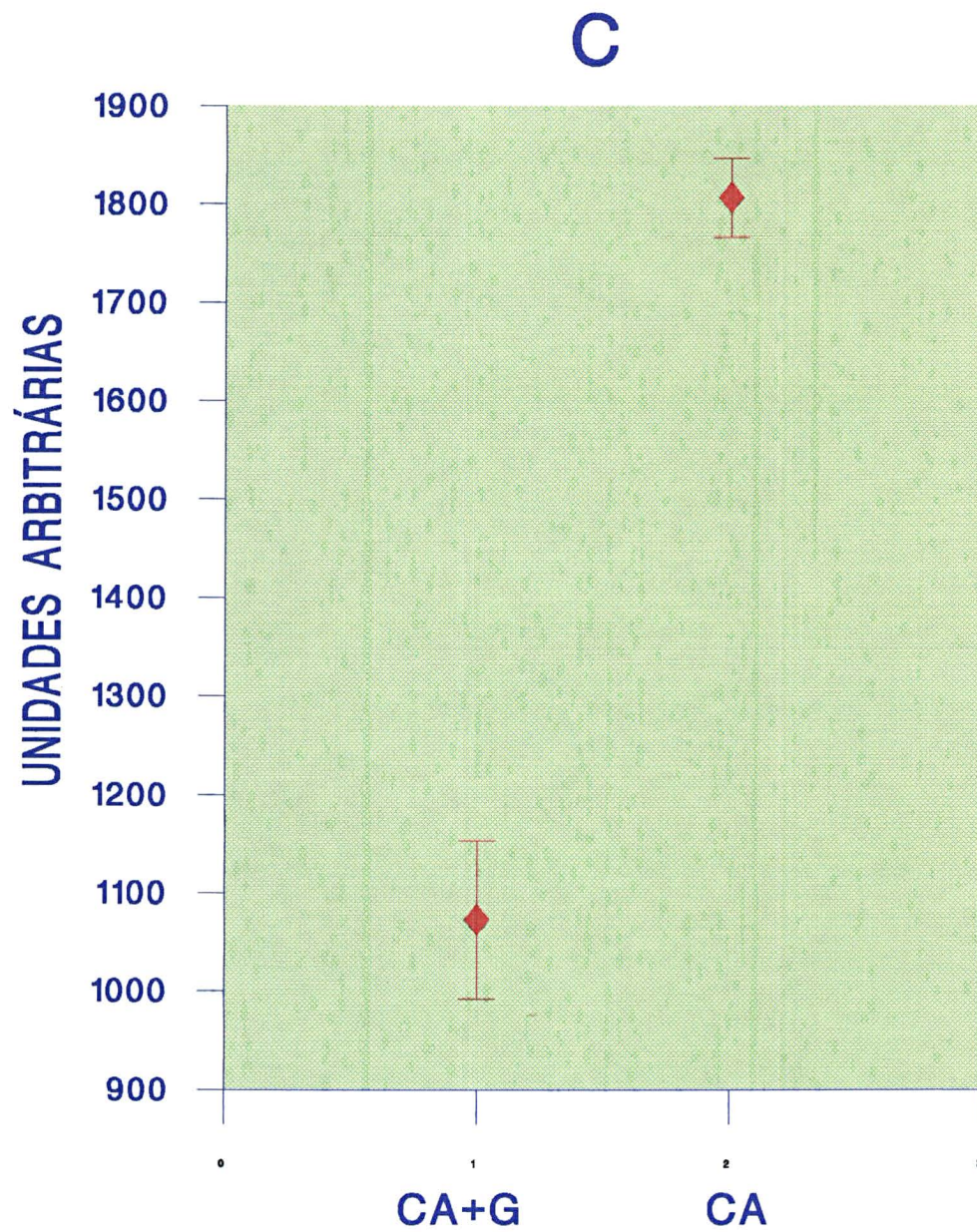


GRÁFICO 6: Representação gráfica da média (+/- erro padrão) do parâmetro contraste (C). CA = câncer de mama; G = gestação ($p < 0.001$)

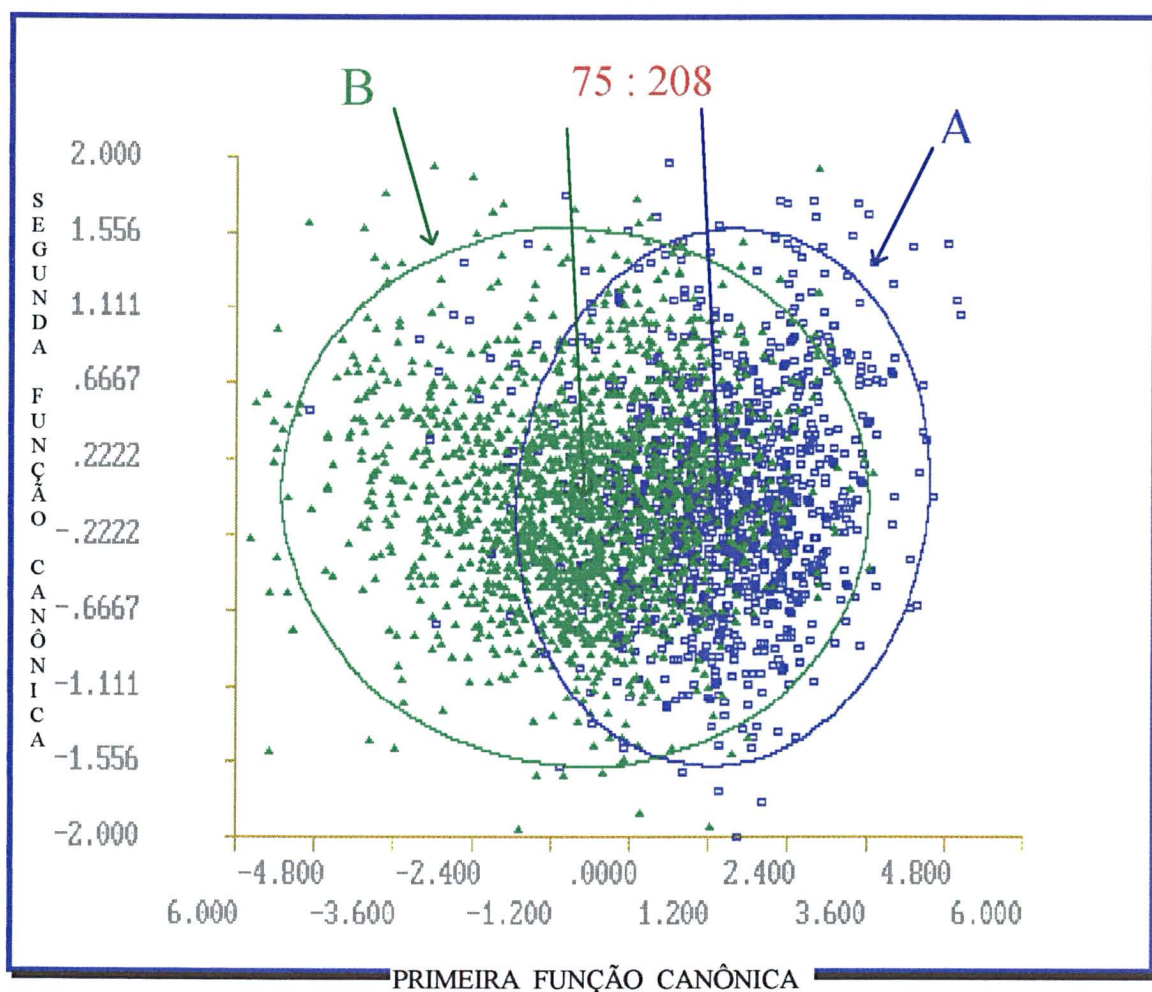


GRÁFICO 7: Análise multivariada dos 15 parâmetros estudados pelo tratamento em componentes principais com transformação canônica. Cada elipse representa o intervalo de confiança de 95% da distribuição celular fatorial. **Elipse A = $CA+G < 20$** (1010 núcleos); **elipse B = $CA+G > 20$** (1713 núcleos). Os valores “a:b” significam: nível de discriminação entre os grupos de 75% (a), e 208 (b) o poder de discriminação F de Fisher-Snedecor ($p < 0.0001$). Cada ponto representa a posição espacial com transformação canônica da resultante dos 15 vetores (determinados pelos 15 parâmetros) de 1 núcleo estudado.

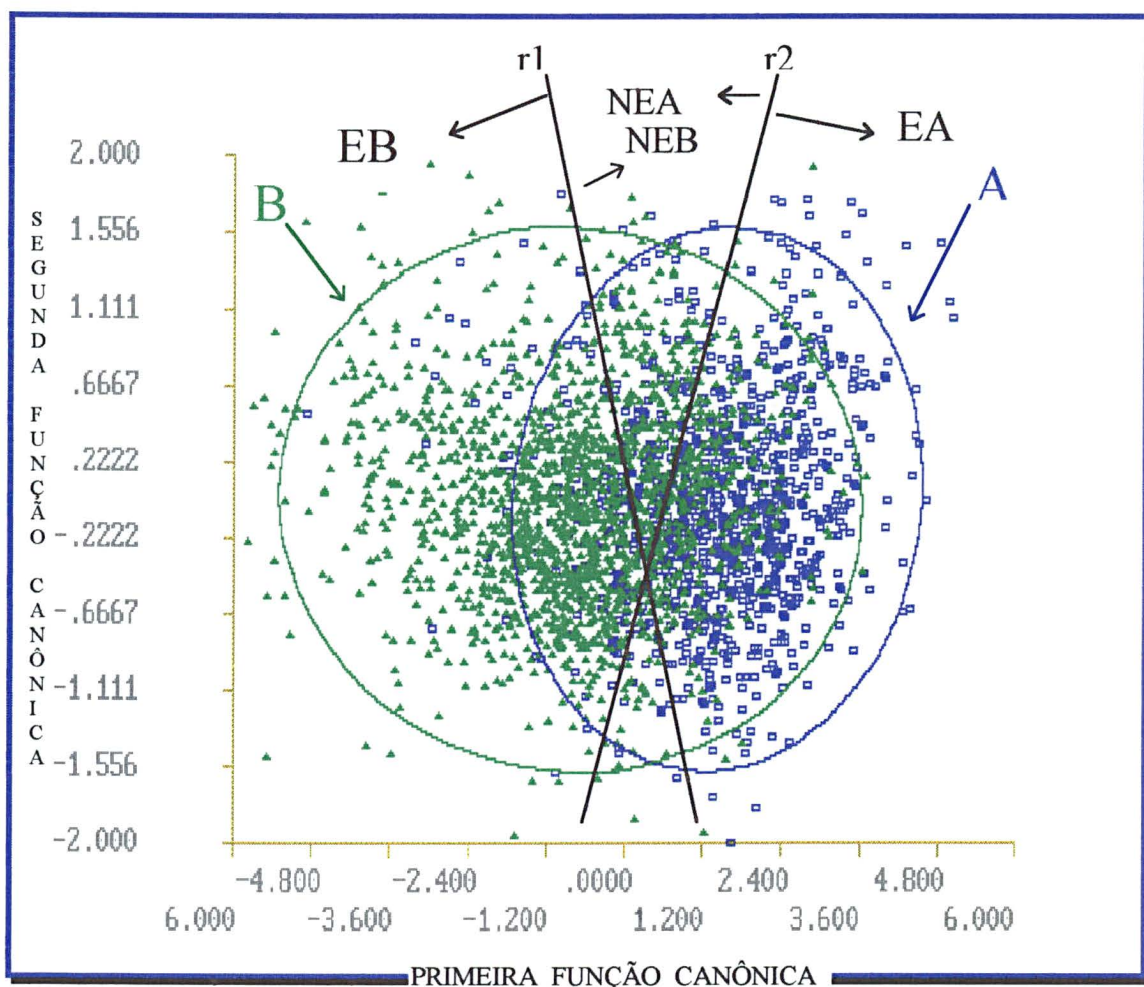


GRÁFICO 8: Representa as regiões obtidas para filtrar as células típicas de cada elipse. As elipses foram cortadas pelas duas retas ($r1$ e $r2$) para delimitar a área específica (EA) da elipse A ($CA+G<20$), e (EB) da elipse B ($CA+G>20$). Os núcleos das áreas não específicas das elipses A e B (NEA e NEB), serão eliminados evidenciando assim, as células mais características de cada grupo, como mostra o próximo gráfico.

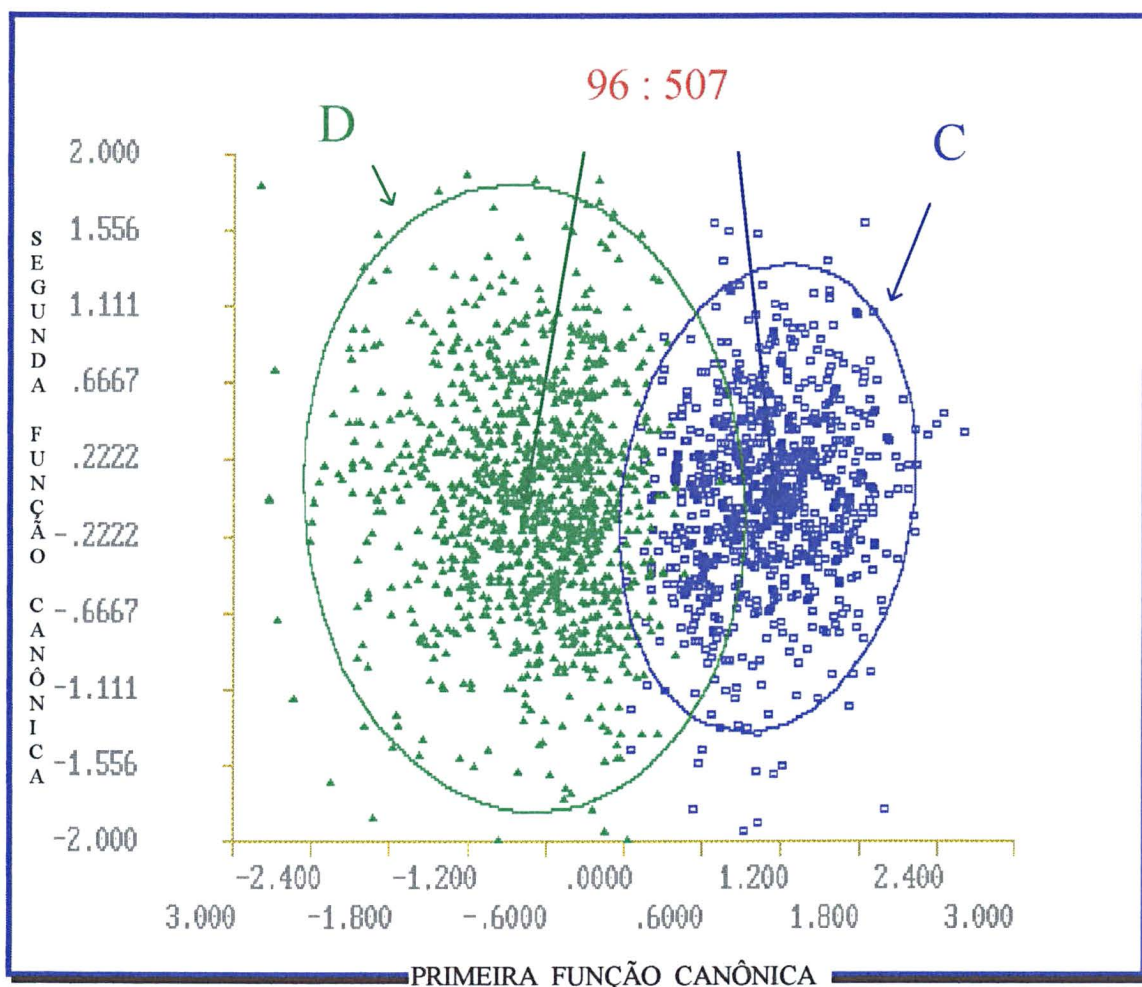


GRÁFICO 9: Análise multivariada realizada após a filtragem do gráfico anterior. Os núcleos da área específica (EA) da elipse A ($CA+G<20$), estão agora representados pela elipse C (758 núcleos), e os núcleos da área específica (EB) da elipse B ($CA+G>20$), estão representados pela elipse D (1071 núcleos). Os valores “a:b” são agora mais discriminantes entre as populações celulares tumorais, em comparação ao Gráfico 7.

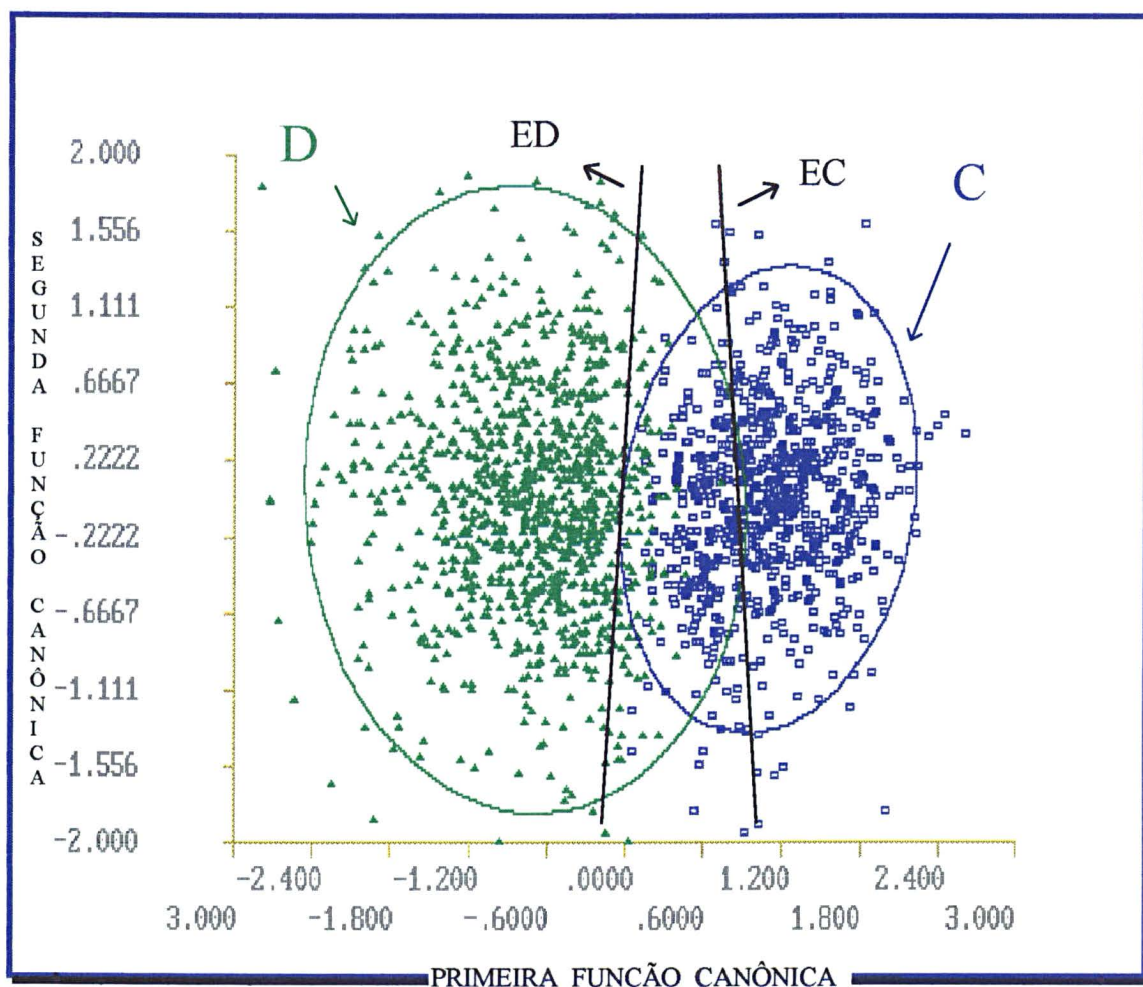


GRÁFICO 10: Representa uma nova filtragem. Os núcleos da área específica (EC) da elipse C ($CA+G<20$), e os núcleos da área específica (ED) da elipse D ($CA+G>20$), serão individualizados para eliminar a área de sobreposição das elipses, criando assim um “banco de dados” específico de cada grupo de estudo, a ser analisado no próximo gráfico.

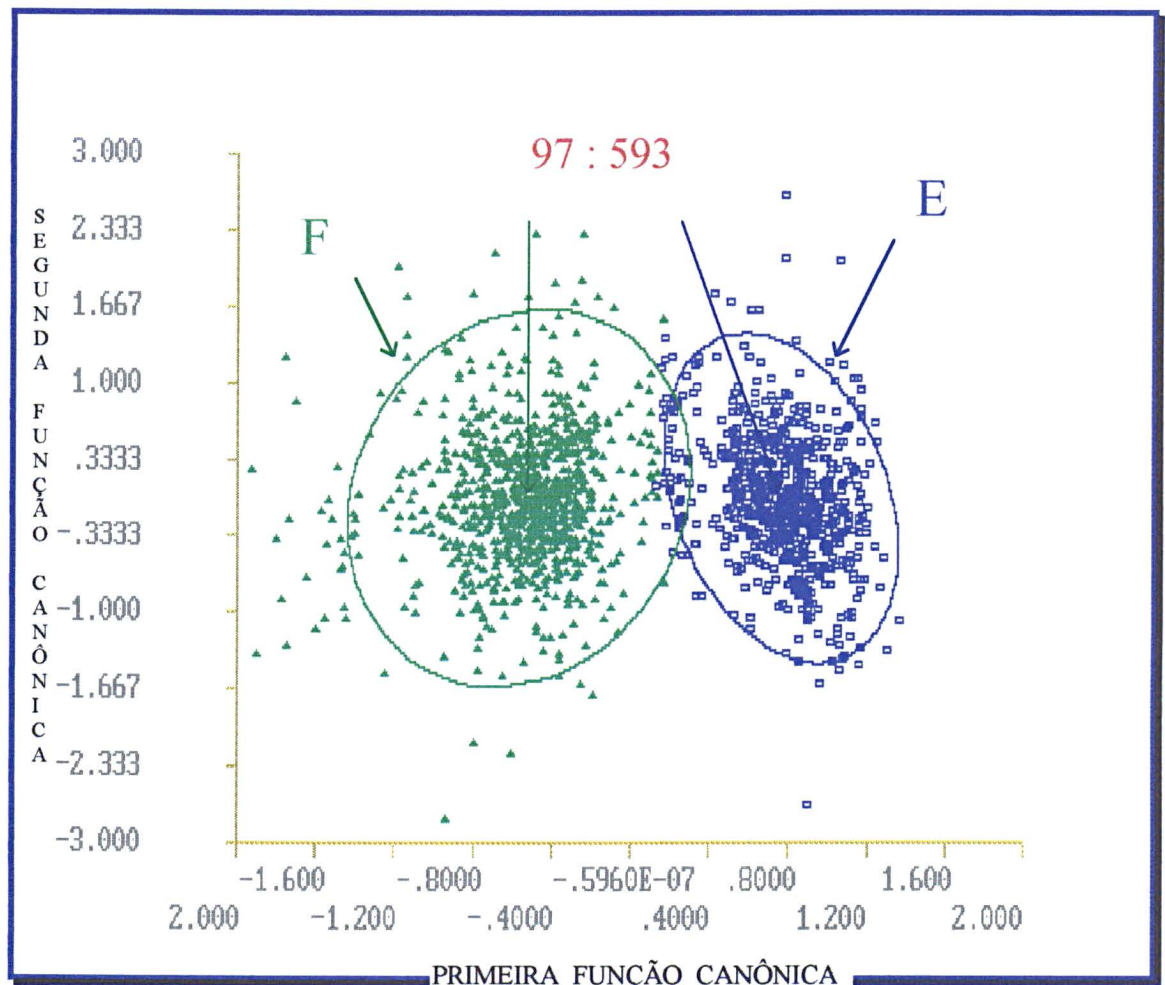


GRÁFICO 11: Representa a análise multivariada dos “bancos de dados” filtrados como mostram os gráficos anteriores, representados pelas elipses E (663 núcleos)(CA+G<20) e F (894 núcleos)(CA+G>20). Os valores “a:b” revelam que estas populações celulares são ainda mais discriminantes entre si.

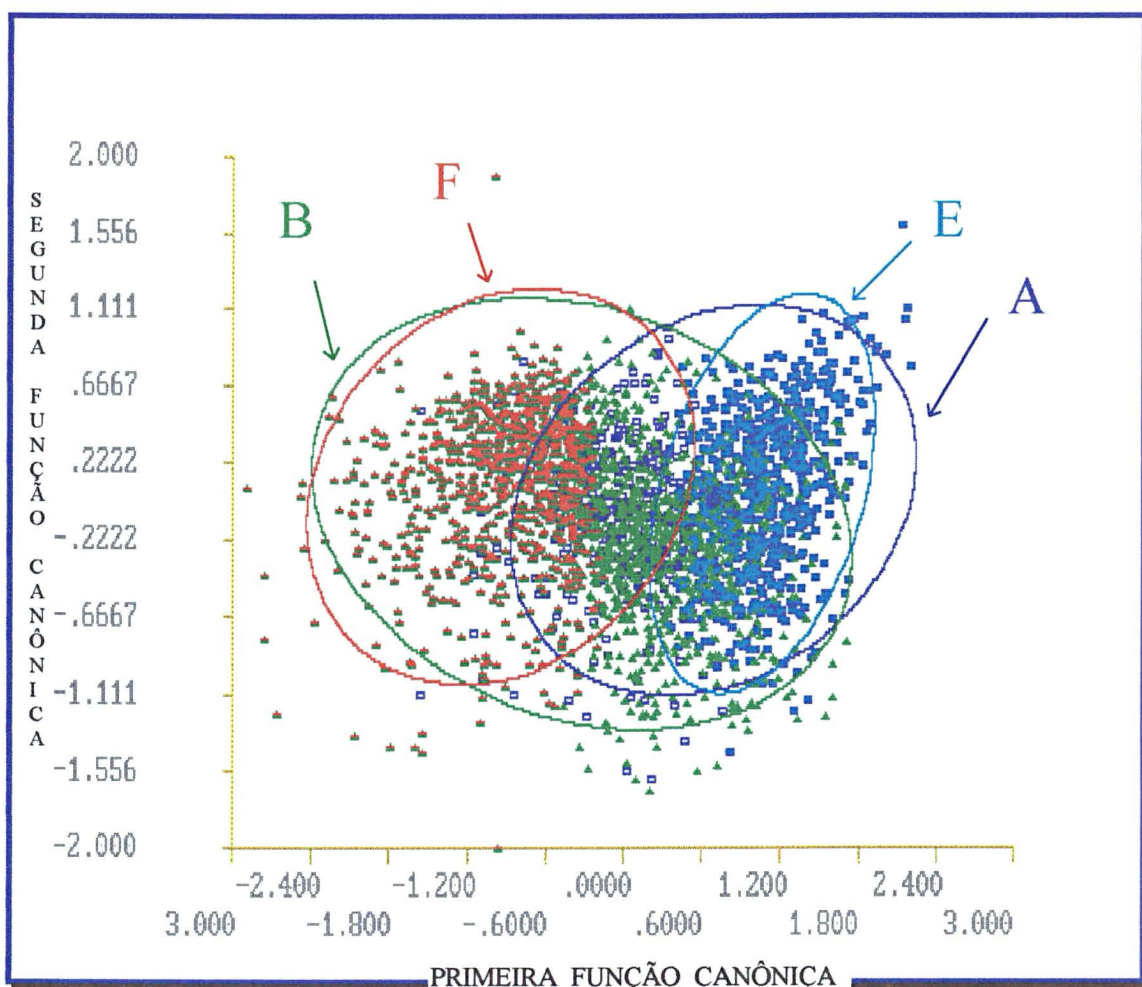


GRÁFICO 12: Análise multivariada realizada com as populações celulares originais (elipses A e B) e as populações celulares filtradas (elipses E e F). A elipse E representa parte do “banco de dados” da elipse A, pois está contida na elipse A, assim como, a elipse F representa parte do “banco de dados” da elipse B pois está contida na elipse B. As elipses E e F pouco se tocam, revelando a discriminação entre as células filtradas de cada grupo.

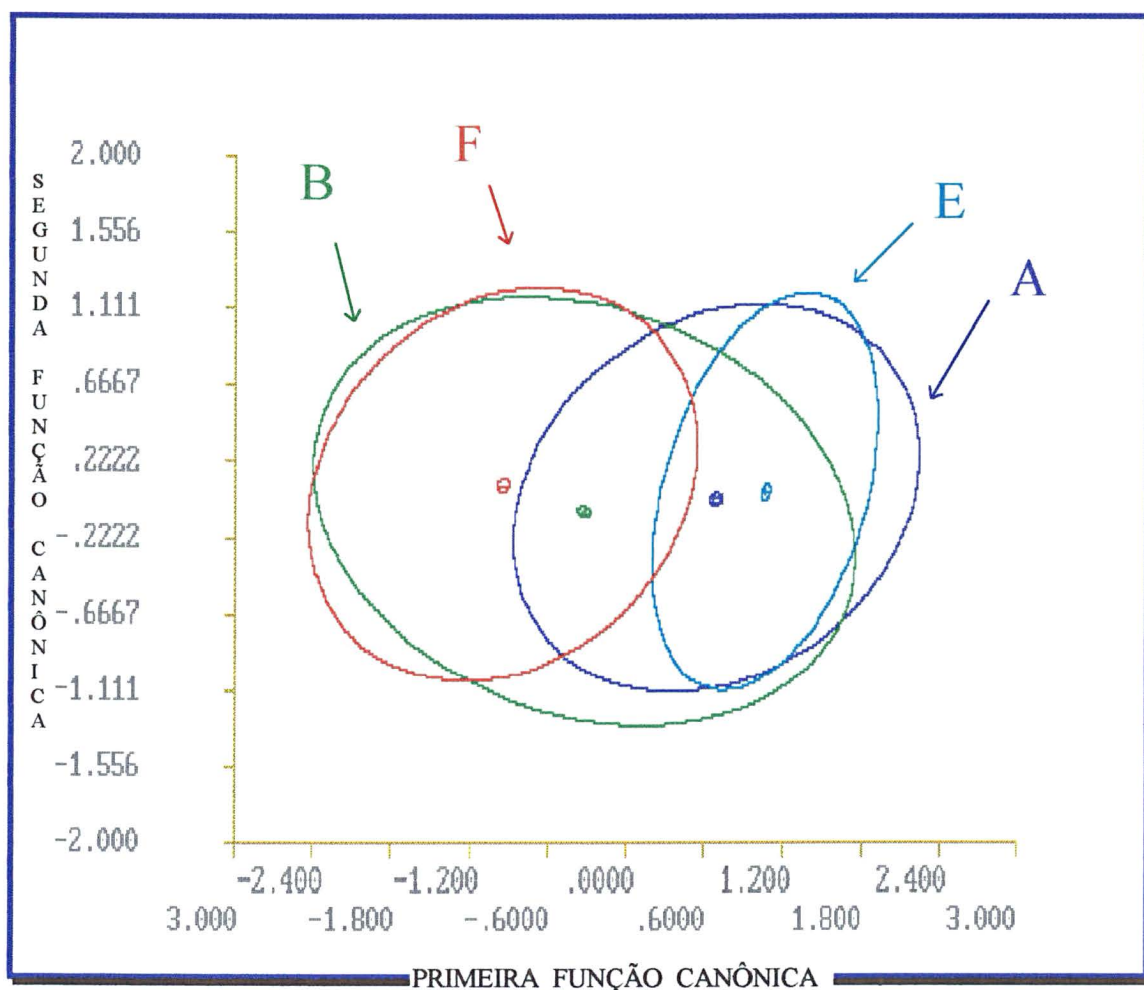


GRÁFICO 13: Mesmos resultados demonstrados no Gráfico 12. Eliminou-se a representação gráfica dos núcleos individualizados por pontos, para facilitar a interpretação das elipses.

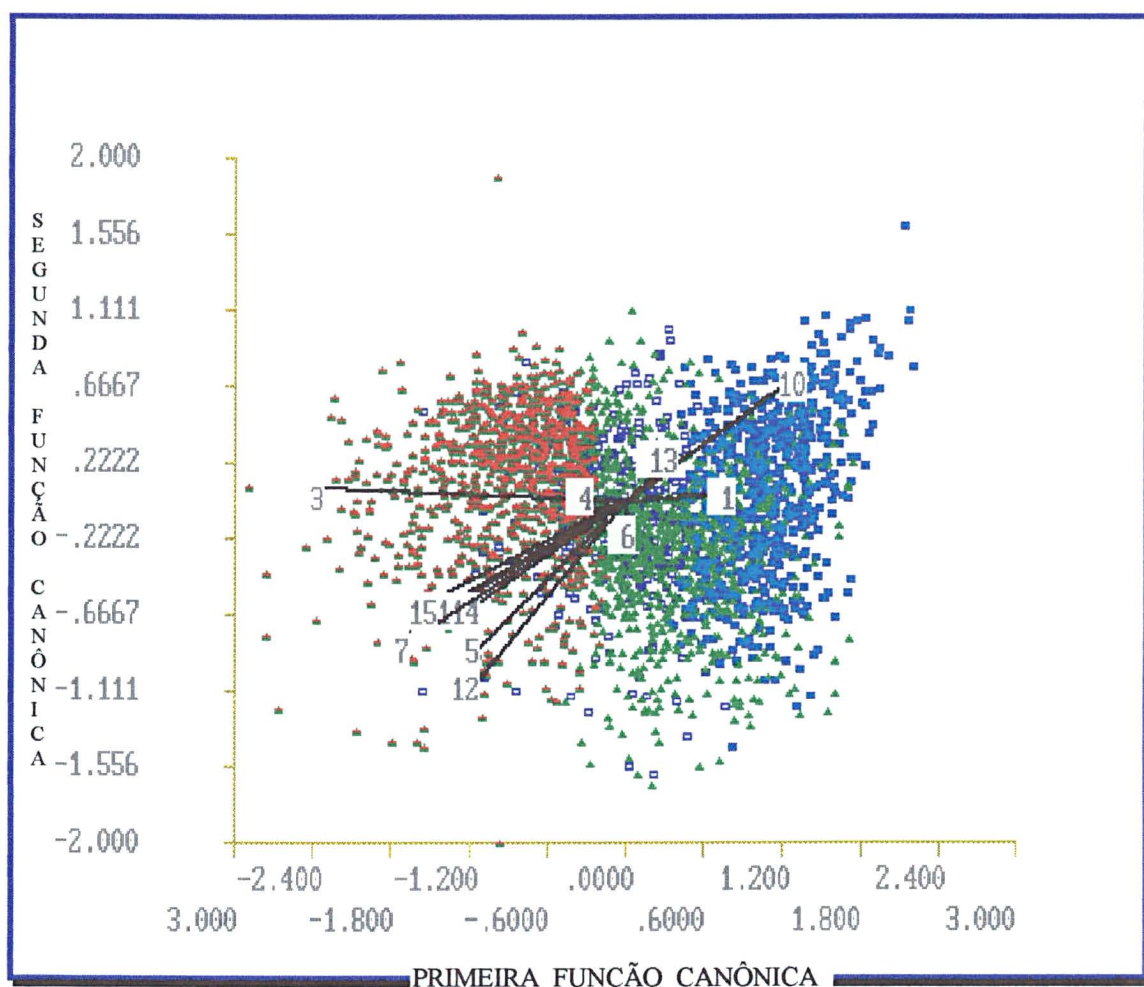


GRÁFICO 14: Representação gráfica das resultantes dos 15 vetores (determinados pelos 15 parâmetros estudados). Quanto maior o vetor, maior é o seu poder discriminatório entre as populações celulares, segundo sua direção no espaço. A distribuição celular fatorial com transformação canônica das 4 populações celulares representada pelos pontos, é a mesma demonstrada no Gráfico 12 (contidas pelas elipses A, B, E e F).

ÁREA NUCLEAR

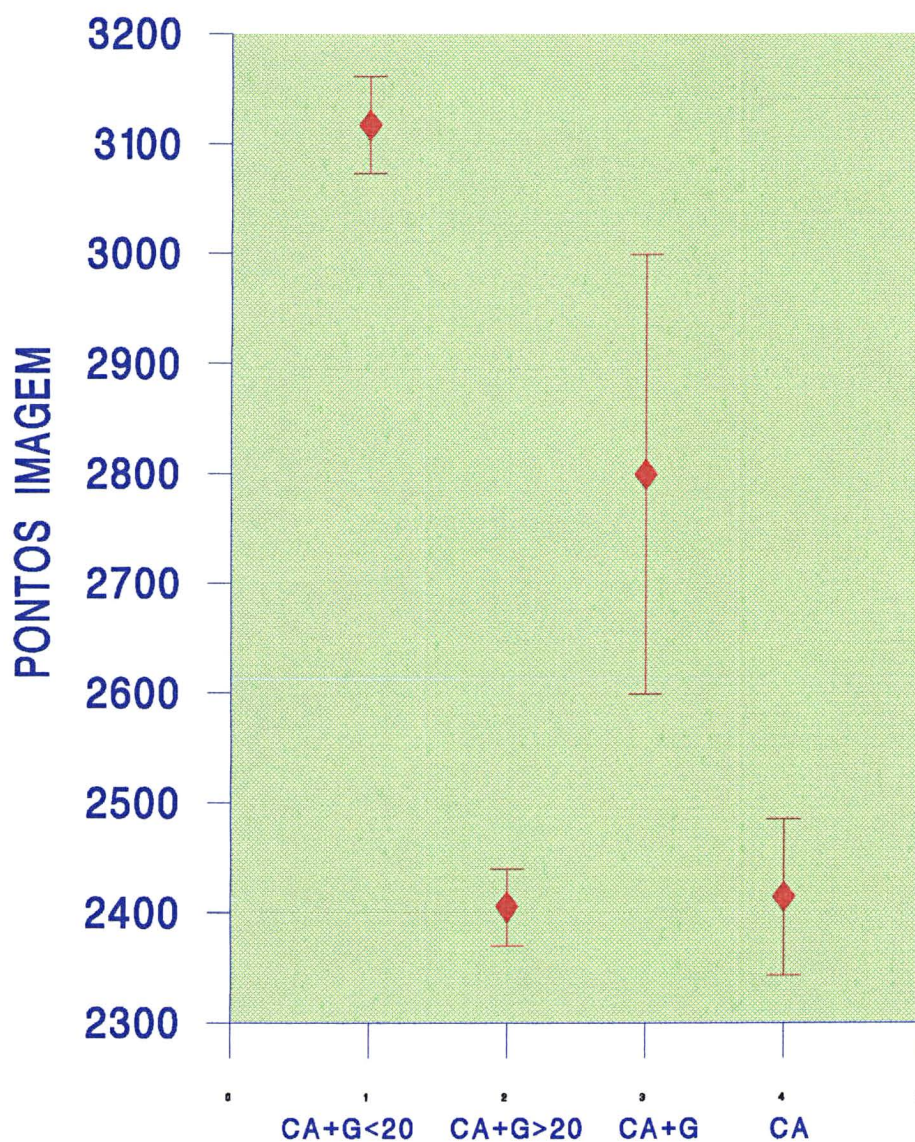


GRÁFICO 15: Representação gráfica da média (\pm erro padrão) da área nuclear dos grupos de estudo. CA = câncer de mama; G = gestação. 20 = semanas de gestação. (CA+G<20 versus CA+G>20; $p<0.001$)

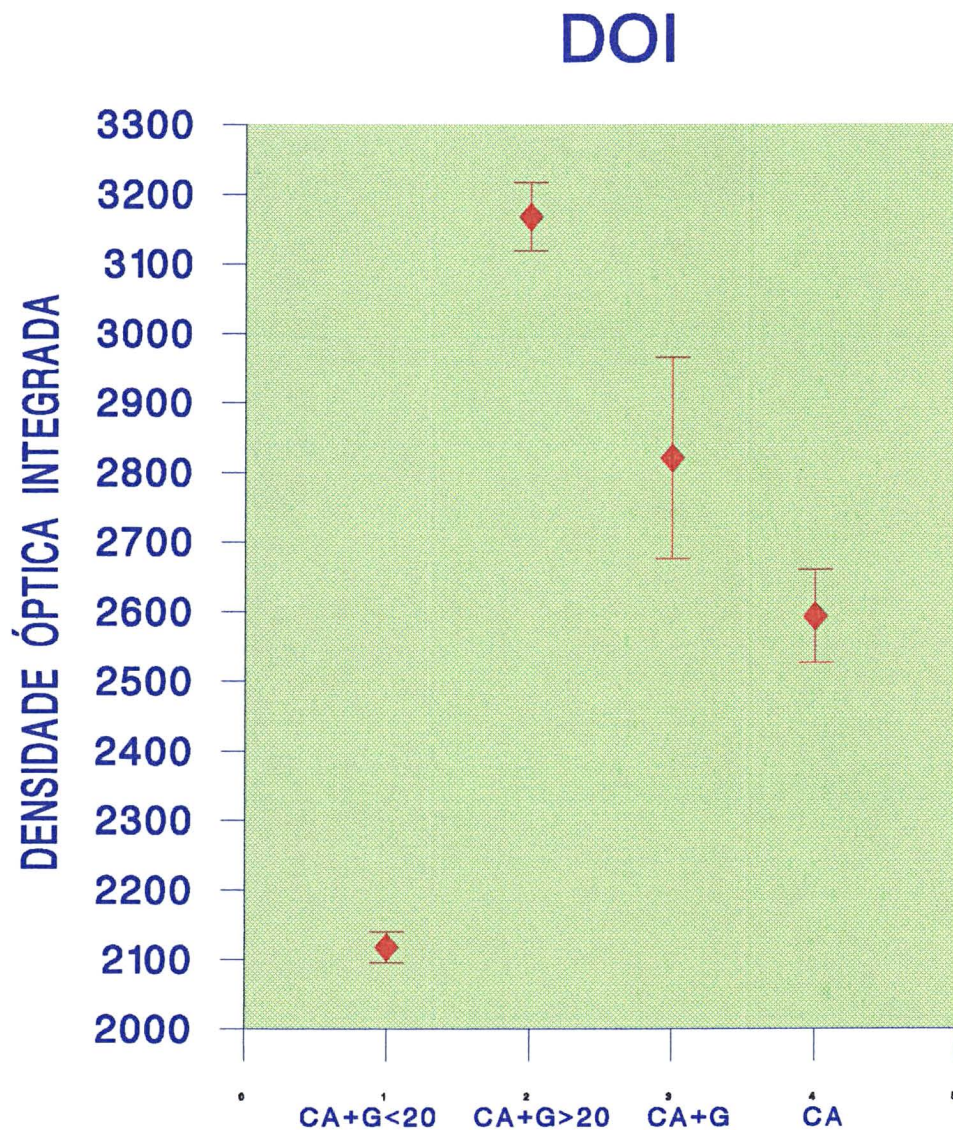


GRÁFICO 16: Representação gráfica da média (\pm erro padrão) da densidade óptica integrada (DOI) dos grupos de estudo. CA = câncer de mama; G = gestação. 20 = semanas de gestação. (CA+G<20 versus CA+G>20; $p<0.001$)

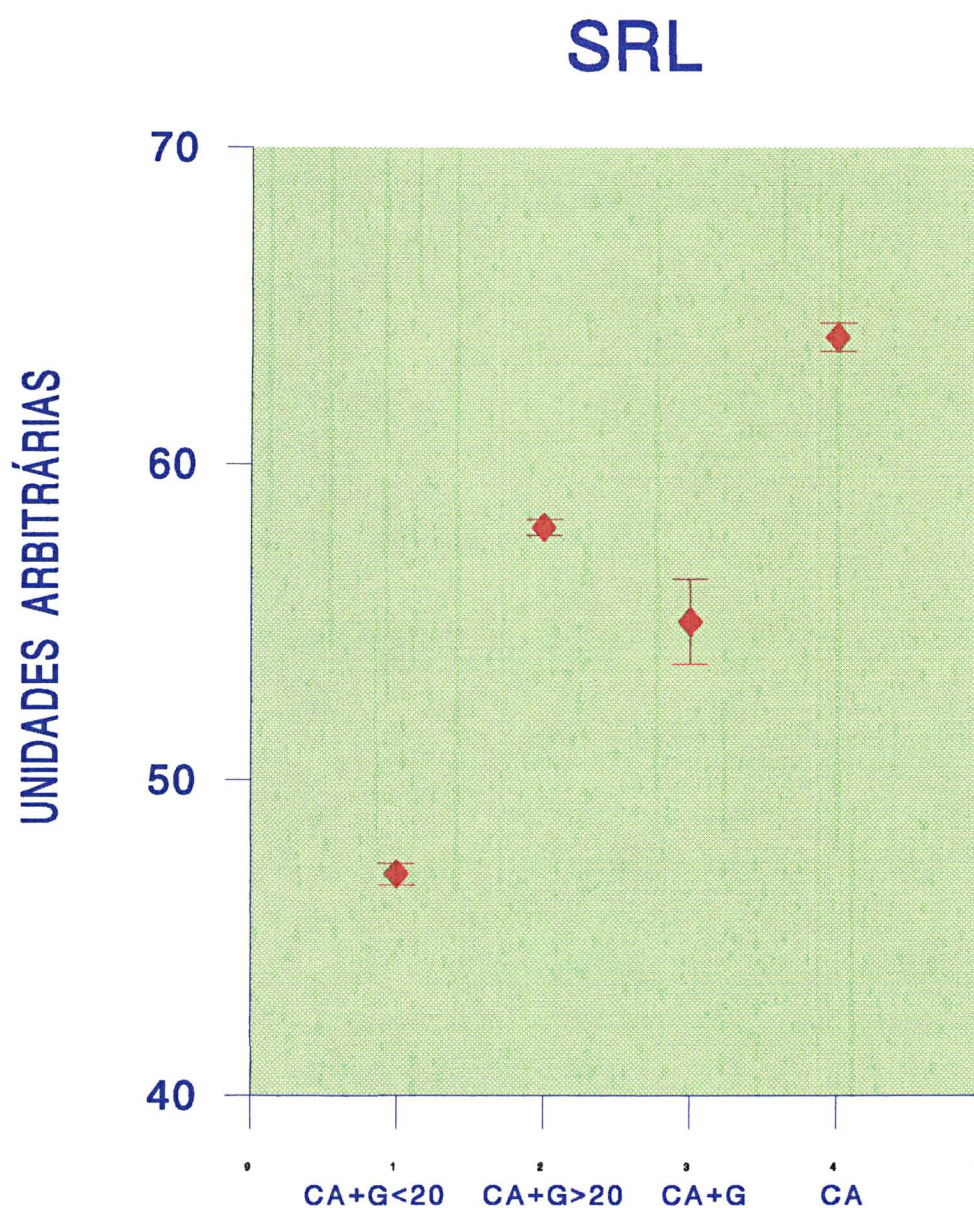


GRÁFICO 17: Representação gráfica da média (+/- erro padrão) da frequência de curtas secções de cromatina (SRL) nucleares. CA = câncer de mama; G = gestação. 20 = semanas de gestação. (CA+G<20 versus CA+G>20; $p<0.001$)

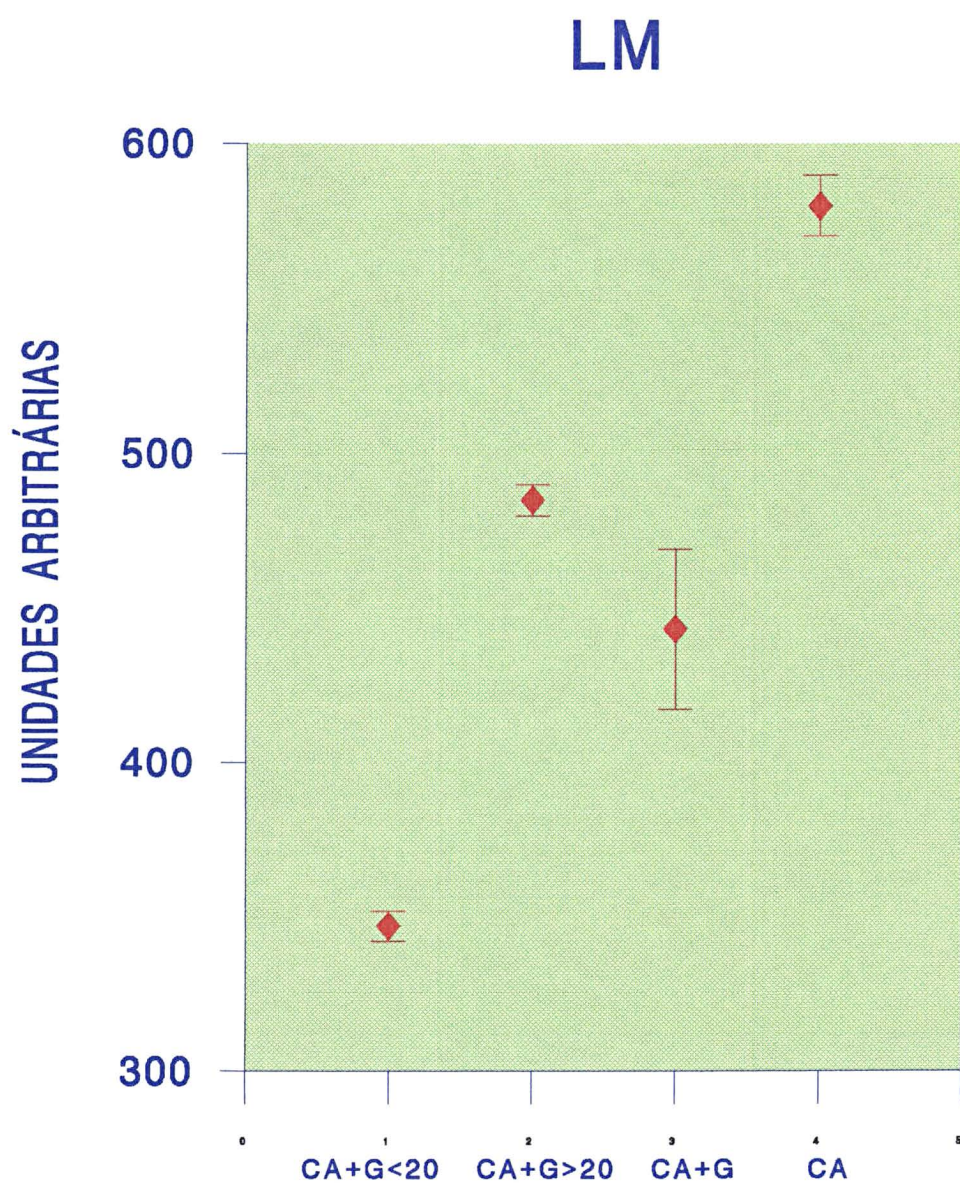


GRÁFICO 18: Representação gráfica da média (\pm erro padrão) da condensação global da cromatina (parâmetro LM: "local mean"). CA = câncer de mama; G = gestação. 20 = semanas de gestação. (CA+G<20 versus CA+G>20; $p<0.001$)

TIPO HISTOGRAMA	CA+G 22 / 100%	CA 88 / 100%
I	10 / 45,5%	49 / 56%
II	0 / 0%	2 / 2%
III	1 / 4,5%	5 / 6%
IV	0 / 0%	8 / 9%
V	3 / 14%	14 / 16%
VI	8 / 36%	10 / 11%

TABELA 1: Classificação em tipos de histogramas dos casos estudados. Apresentação em números absolutos e em porcentagens. CA = câncer de mama; G = gravidez. (tabulação cruzada, $p=0.08$)

	CA + G	CA
	22 = 100%	88 = 100%
TIPOS I, II, III, IV e V	14 = 64%	78 = 89%
TIPOS VI	8 = 36%	10 = 11%

TABELA 2 : Apresentação dos números absolutos e em porcentagem, dos tumores classificados com tipos de histogramas I, II, III, IV e V versus tipo de histograma VI. CA = câncer de mama; G = gestação (tabulação cruzada, $p=0.012$).

5.0 DISCUSSÃO

A revisão da literatura mostra que nos últimos 50 anos a atitude cirúrgica no câncer de mama associado à gravidez tem mudado radicalmente.

O tratamento cirúrgico atual impõe que, uma vez estabelecido o diagnóstico correto, a paciente grávida seja tratada de forma similar à paciente não grávida.(BARNAVON & WALLACK, 1990; JONES, 1991; SUTTON, 1990). Entretanto, a sobrevida global de 5 e 10 anos apresenta muitas variações o seu prognóstico permanece inalterado como vimos no capítulo Introdução

Poucas informações são publicadas sobre o comportamento biológico do tumor de mama durante a gravidez. Isto se deve à baixa frequência com que ocorre e ainda porque as novas técnicas em desenvolvimento necessitam de alguns anos mais de acompanhamento para que se possa comparar os resultados obtidos com a sobrevida da paciente. (ANDERSON, 1979; ELLEDGE, 1993). A técnica utilizada em nosso trabalho permitiu, de forma retrospectiva, através da utilização do material anátomo-patológico de arquivo, estabelecer uma correlação do ponto de vista biológico morfonuclear para melhor compreensão da influência do período gravídico e de lactação.

A utilização deste material proveniente de três hospitais diferentes dificultou, entretanto, a avaliação clínica das pacientes para o procedimento de análise multivariada, devido a falta de preservação da paciente oncológica em nosso meio, o que impossibilitou um acompanhamento além de 5 anos de sobrevida em mais de 50% das pacientes. Esta série contém material de arquivo dos últimos 30 anos. Variações das diferentes formas de estadiamento e informações dos arquivos clínicos e a pequena casuística, poderiam comprometer a análise estatística nas suas diferentes estratificações (estadiamento, sobrevida, intervalo livre de doença, comprometimento ganglionar, etc.).

Justificativa da escolha da análise de imagem como método de investigação.

Como indicou MOSTOFI, (1975), o valor prognóstico que se pode associar a um câncer depende essencialmente de três fatores:

1. da resposta do paciente ao tratamento;
2. da precisão com a qual o clínico estabeleceu o diagnóstico, e
3. das características biológicas do câncer .

Van der POELL et al., (1992), reportaram que Virchow tinha, já em 1858, noções das características morfonucleares dos cânceres e tentava correlacioná-las com sua agressividade.

O anátomo-patologista adquire então um papel preponderante na cancerologia, pois deve definir não somente a agressividade tumoral mas avaliar igualmente a eventual resposta do tumor ao tratamento proposto. É por esta razão que ele tenta classificar os diferentes tumores analisados, e o objetivo desta classificação é criar subgrupos homogêneos, constituídos por tumores que apresentam um mesmo perfil clínico. Desta maneira, utiliza as características morfológicas dos tumores, descreve o mais precisamente possível seu aspecto citológico e sua organização arquitetural; define igualmente a extensão tumoral.

Isto pode parecer simples à primeira vista, mas na realidade certos tumores podem aparecer como entidades próprias e pertencerem a um subgrupo patológico preciso e, longe de ser evidente, este fato torna-se, ao contrário, um tanto artificial e talvez subjetivo, uma vez que estes tumores pertencem a um subgrupo patológico obrigatoriamente correlacionado à evolução clínica esperada.

Concernente à maneira como os patologistas procedem para elaborar as classificações, observa-se em geral atitudes distintas. A primeira destas atitudes consiste em definir os subgrupos tumorais por um termo descritivo que pode estar associado a um valor prognóstico. A segunda atitude consiste em graduar a agressividade tumoral, como é o caso para os cânceres de mama "clássicos" ditos "NOS" divididos em três graus (GI, GII, GIII), os tumores GI, supostamente menos agressivos (SCARFF E TORLONI, 1968). Esta classificação dos tumores da mama tipo NOS (do inglês, abreviação não especificado de outra forma) é efetuada quantificando-se os seguintes critérios morfológicos: 1) O grau de anisonucleose; 2) atividade mitótica e 3) grau de diferenciação glandular. Numerosos tipos de tumores ou lesões são assim classificadas em três graus como os casos de tumores de próstata, (MOSTOFI, 1975), os tumores astrocitários (BURGER et al., 1985) e ainda as displasias do colo uterino (RICHART, 1966).

Admite-se que a análise informatizada da imagem nuclear e a citometria de fluxo podem contribuir com preciosas informações aos patologistas quanto às propriedades biológicas de certos tumores. Estes dois métodos oferecem a possibilidade de avaliar o índice de proliferação e a taxa de ploidia da maioria dos tumores: esses parâmetros mostram-se muito úteis na descrição, por

exemplo, da agressividade dos tumores do ovário (MILLER et al., 1991), da bexiga (TRIBUKAIT, 1978), do cólon (GIARETTI et al., 1991) e dos neuroblastomas (TAYLOR & LOCKER, 1990). Uma revisão completa da literatura sobre o aporte de tais técnicas foi efetuado por quatro grupos de pesquisa que publicaram seus resultados em 1989, no mesmo volume da revista Human Pathology (AUER et al., 1989; KOSS et al., 1989; WIED et al., 1989). Estes parâmetros permitem elaborar novos fatores prognósticos capazes de validar *a posteriori* certos subgrupos tumorais antigamente elaborados a partir de critérios puramente histológicos.

Além dos parâmetros acima mencionados, a análise de imagem permite, em relação à citometria de fluxo, o acesso a numerosos parâmetros morfonucleares que descrevem o tamanho do núcleo, assim como suas características cromatinianas. Descrevemos acima a importância destes critérios para estabelecimento das classificações tumorais. Razão pela qual se deu preferência à análise de imagem, em detrimento da citometria de fluxo, na realização do presente trabalho.

O método de Feulgen

Este método foi escolhido para o presente trabalho por ser o único que permite quantificar o ADN contido em cada núcleo celular examinado, também possibilitando análise dos critérios do tamanho nuclear e a organização da cromatina. Permite comparar estes resultados aos referidos na literatura, que utilizam a citometria de fluxo para quantificar o ADN, ainda aportando informações morfológicas complementares. Em condições padronizadas admite-se unanimemente que o método de Feulgen colore o ADN de maneira específica e quantitativa e que ele se presta ainda a medidas de densitometria (GIROUD et al., 1987). Entretanto, esta coloração do ADN é de tal maneira específica que não é possível obter outras informações que as do núcleo celular.

Discussão dos parâmetros morfométricos utilizados

1. Área nuclear

O parâmetro "área", tal como é descrito no capítulo Material e Métodos, mede o número de pixels ocupados pela projeção do núcleo sobre a preparação. Não é, portanto, a área real do núcleo, mas uma maneira de medi-la

dentro de condições objetivas. Este critério revela-se precioso nos trabalhos de outros autores, sobre diversas patologias da mama (LARSIMONT et al., 1989a). No presente trabalho houve um aumento significativo da área nuclear no grupo câncer de mama e gravidez, em comparação ao grupo de pacientes com câncer de mama fora do período gestacional (Gráfico 1). Observou-se também que, após a realização da matemática multivariada para os casos de tumores mamários durante a gravidez, esse fenômeno ocorria nos tumores diagnosticados na primeira metade da gravidez.

2. Quantidade de ADN nuclear

O parâmetro DOI (densidade óptica integrada) permite o acesso ao cálculo da taxa de ploidia e da taxa de proliferação. Desde que aplicada sob forma de média, o conjunto das medidas efetuadas sobre uma população celular constitui-se em equivalente do parâmetro DI ("DNA index"), freqüentemente utilizado na literatura.

Nos resultados deste trabalho não houve diferença significativa entre os parâmetros analisados através da estatística monovariada. Assim, à primeira vista a gravidez não parece interferir diretamente neste parâmetro. Mas, quando são submetidos à análise multivariada, os tumores diagnosticados no período gravídico puerperal, apresentam aumento significativo nos valores deste parâmetro, em comparação com a primeira metade.

Índice de proliferação

Este índice está consagrado pela literatura (OPFERMAN et al., 1987), e tem por finalidade mostrar a intensidade da síntese de DNA em um tumor, pelo estudo da proporção dos núcleos que fogem dos valores dos picos médios de ploidia da população celular. Trata-se necessariamente de uma aproximação, caso haja outras populações que, no histograma, fujam do pico G0-G1 e que sejam minoritárias, não caracterizando uma população típica (aneuplóides não proliferantes). Nestes casos, o cálculo do índice de proliferação tornar-se-ia impossível e poderia fornecer resultados aberrantes. (Figura 5 D e H).

Um exemplo simples permite tal explicação: em uma população celular com maioria de células diplóides (picos 2c-4c), a presença de uma minoria de células triplóides em fase G0-G1 (3c) pode ser interpretada, erroneamente, como representativa de células diplóides em fase S. Em tal caso tenta-se evitar o erro, pesquisando a presença de algumas células 6c que prova a presença de uma

sub população triplóide. Isto é realizado graças à precisão da dosagem individual do DOI dos núcleos tumorais e graças à preocupação de definir o perfil da ploidia da população celular.

Como foi definido no capítulo Material e Métodos, utilizou-se recursos e critérios muito restritos de seleção de células presumivelmente em fase S para o cálculo do índice de proliferação.

Este cálculo foi realizado, contudo não se chegou a resultados significantes, quando comparados o câncer da mama durante ou fora da gravidez.

ADN index (DI).

Não foi observada diferença entre os grupos estudados. O ADN index, utilizado na literatura da citometria de fluxo, é a média da quantidade de ADN no conjunto dos núcleos tumorais examinados, comparados ao valor de um dado controle de uma população celular diplóide em fase G0-G1 (2c) (HIDDEMAM et al., 1984). Acredita-se que tal valor médio pode corresponder, na realidade, a situações bem diferentes. Um tumor que contenha uma proporção equivalente de células diplóides e tetraplóides não proliferantes apresentará um valor de DI igual a 1.50, tal qual um tumor triplóide não proliferante. Isto poderia explicar porque a utilização abusiva do ADN index leva a resultados inconclusivos, observados por numerosos pesquisadores que quiseram fazer dele um marcador de uso clínico (BANEZ et al., 1992; GHALI et al., 1992).

O perfil da ploidia de um tumor.

Os parâmetros clássicos "Índice de proliferação" e "DI", foram examinados mais detalhadamente com histogramas de valores da taxa de DNA de uma população tumoral. Observou-se, assim, que os tumores são caracterizados por um perfil de ploidia desigual. AUER et al. (1987) foram os primeiros a tentar avaliar a ploidia através de histogramas com medidas de taxa de ADN em núcleos de tumores de mama. Repartiram as células em quatro classes: diplóides não proliferantes, diplóides proliferantes, tetraplóides e aneuplóides. A nova classificação proposta pelo laboratório onde foi desenvolvido o presente trabalho, apresenta uma classificação mais completa que trouxe subsídios importantes a esta tese. Segundo tal classificação, a distribuição dos diferentes tipos de histogramas de ploidia tumoral (I, II, III, IV, V e VI) é representada na Tabela 1, e utilizando-se do teste da tabulação cruzada, os valores mostraram-se não

significativos ($p=0.08$). O mesmo teste estatístico é significativo quando comparamos os tumores tipo VI (aneuplóides) com os outros tipos de histogramas.

Observou-se maior incidência estatisticamente significativa ($p=0.012$) de tumores polimorfos ou aneuplóides no grupo câncer de mama e gravidez (Tabela 2), caracterizando possivelmente maior agressividade dos tumores durante o período gestacional, ou retratando a idade tumoral em que o diagnóstico é feito em fase mais avançada da doença.

Textura da cromatina

A distinção da cromatina dispersa (eucromatina) e cromatina condensada (heterocromatina) foi justificada posteriormente pela Biologia Molecular. Demonstrou-se que na cromatina dispersa, o ADN está associado sob forma de nucleossomos às histonas H2A, H2B, H3 e H4, na ausência da histona H1. A histona H fixa-se nos intervalos livres de ADN entre os nucleossomos, condensa estes últimos em agrupamentos densos, provavelmente inacessíveis à transcrição.

Numerosas observações de microscopia óptica podem estar relacionadas à estas bases bioquímicas: cromossomo X inativado em quase totalidade sob forma de corpúsculo de Barr, condensação mais ou menos reversível da cromatina em função da diferenciação celular (eritroblastos, plasmócitos, etc.). As mesmas observações demonstram que a fixação histológica fornece à cromatina uma aproximação grosseira e provavelmente cheia de artefatos. Esse método se impôs na anatomia patológica do câncer e constitui-se em um dos critérios mais confiáveis da avaliação da malignidade (KOSS et al, 1979). SALMON, (1992, 1993) observou que, para a fixação do material a ser analisado, é critério importante a observação da textura da cromatina. Uma das causas de erro pode ser atribuída a um eventual "ressecamento" celular. Por exemplo, os núcleos obtidos por esfregaço da peça operatória apresentam valor diferente dos parâmetros texturais em relação aos núcleos obtidos por punção pré-operatória. Demonstrou-se que certos parâmetros texturais são mais sensíveis que outros em relação ao seu modo de aquisição. É o caso dos seguintes parâmetros: LRL, LM e C (de LAUNOIT et al, 1990; SALMON et al, 1993; GASPERIN et al, 1992). Os resultados deste trabalho revelaram um aumento estatisticamente significativo para os parâmetros texturais LRL ($p=0.006$), e um decréscimo estatisticamente significativo dos parâmetros SRL ($p<0.001$), LM

($p < 0.001$) e C ($p < 0.001$), no grupo câncer de mama e gravidez em comparação ao grupo câncer de mama fora da gravidez.

A análise multivariada realizada no grupo câncer de mama e gravidez (Gráficos 7 a 14) evidenciou os núcleos típicos segundo a idade gestacional de acordo com a proposta de divisão em duas metades de idades gestacionais distintas (primeira metade abaixo de 20 semanas e segunda metade acima de 20 semanas de gestação e puerpério). Nestes núcleos evidenciados, agora submetidos a análise monovariada, revelou-se aumento estatisticamente significativo ($p < 0.001$) dos valores dos parâmetros SRL e LM, na segunda metade da gravidez em relação à primeira (gráficos 17 e 18).

Estes resultados revelam que os critérios de organização da cromatina constituem um subsídio apreciável à discriminação morfonuclear dos tumores. LARSIMONT (1989), refere que tumores com diferentes concentrações de receptores de estrógeno e progesterona apresentam modificações morfonucleares e texturais. Quando se compara esses resultados com os encontrados no presente trabalho observa-se semelhança, notavelmente nos parâmetros de área nuclear (NA) e longas secções da cromatina (LRL). Abre-se a questão sobre este paralelismo morfonuclear e as alterações hormonais que ocorrerem no tumor durante a gravidez.

Estas diferenças morfonucleares encontradas podem significar um crescimento tumoral mais rápido ou alterações típicas dos tumores avançados (idade tumoral), característicos do carcinoma da mama associado à gravidez.

6.0 CONCLUSÕES

1. Nesta série de pacientes houve maior incidência de tumores aneuplóides no grupos de câncer de mama que ocorre durante a gravidez em comparação ao tumor que ocorre fora dela.

2. Os núcleos tumorais das células do grupo CA+G mostraram maior frequência de células com grande área nuclear, diminuição da frequência de curtas secções da cromatina, aumento da frequência das longas secções da cromatina e diminuição da condensação global da cromatina.

3. A análise multivariada foi útil para diferenciar os tumores de pacientes com menos de 20 semanas de gestação e com mais de 20 semanas de gestação. Os tumores de pacientes com menos de 20 semanas de gestação apresentaram aumento da área nuclear, e diminuição dos parâmetros DOI, SRL e LM, em comparação ao grupo de pacientes com mais de 20 semanas de gestação.

4. A análise de imagem apresenta-se útil como método para ajudar a diferenciar os tumores mamários durante e fora da gravidez

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROS, R.A.; PAWEL, B.R.; MESHCHERYAKO, V.I.; KOTROTSIOS, J.; LAMBERT, W.C.; TROST, R.C.** Nuclear morphometric as a prognostic indicator in colorectal carcinoma resected for cure. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 12:172-176, 1990.
- ANDERSON, J.M.** Mammary cancers and pregnancy. *Br. Med. J.* 1:1124-1127, 1979.
- APPLEWHITE, R.R.; SMITH L.R.; DE VINCENT, F.** Carcinoma of the breast associated with pregnancy and lactation. *Ann. Surg.* 39:101-104, 1973.
- ATKIN, N.B.; KAY, R.** Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumours, based on 1465 cases. *Br. J. Cancer.* 40:210-221, 1979.
- AUER G.; ASKENSTEN, U.; ERHARDT, K.; FALLENIUS, A.; ZETTERBERG, A.** Comparison between slide and flow cytometry DNA measurements in breast tumours. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 9:138-146, 1987.
- AUER, G.; ASKENSTEN, U.; AHRENS, O.** Cytophotometry. *Hum Pathol.* 20:518-527, 1989.
- BAAK, J.P.A.; KURVER, P.H.J.; DE SNOO-NIEWLAAT, A.J.E.; DE GRAEF, S.; MAKKINK, B.; BOON, M.E.** Prognostic indicators in breast cancer: morphometric methods. *Histopathology* 6:327-339, 1982.
- BANEZ, E.I.; KRISHNAN, B.; ANSARI, M.Q.; CARRAWAY, N.P.; MCBRIDE, R.A.** False aneuploidy in benign tumors with a high lymphocyte content: a study of Warthin's tumor and benign thymoma. *Hum. Pathol.* 23:1244-1251, 1992.
- BARLOGIE, B.; RABER, M.N.; SCHUMANN, J.; JOHNSON, T.S.; DREWINKO, B.; SWARTZENDRUBER, D.E.; GÖHDE, W.; ANDREEF, M.; FREIREICH, E.** Flow cytometry in clinical cancer research. *CancerRes.* 43:3982-3997, 1983.
- BARNAVON, Y.; WALLACK, M.K.** Management of the pregnant patient with carcinoma of the breast. *Surg. Gynecol. Obstet.* 171:347-352, 1990.

- BARRON, W.M.** The pregnant surgical patient: Medical evaluation and management. *Ann. Int. Med.* **101**: 683-691, 1984
- BIBBO, M.; KIM D.H.; GALERA-DAVIDSON H.; DI LORETO C., DYTCH, H.E.** Architectural, morphometric and photometric features and their relationship to the main subjective diagnostic clues in the grading of prostatic cancer. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **12**:85-90, 1990.
- BLOOM, H.J.G.; RICHARDSON, W.W.** Histopathological grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer.* **11**:359-377, 1957.
- BRUGAL, G.; GARBAY, C.; GIROUD, G.F.; ADHEL, D.** A double scanning microphotometric for image analysis: hardware, software and biomedical applications. *J. Histochem. Cytochem.* **27**:144-152, 1979.
- BUNKER, M.L. & PETERS, M.V.** Breast cancer associated with pregnancy or lactation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **85**: 312-321, 1963.
- CANTER, J.W.; OLIVER, G.C.; ZALONDEK, C.J.** Surgical diseases of the breast during pregnancy. *Clin. Obstet. Gynecol.* **26**:853-864, 1983
- CLARK, R.M. ; REID J.** Carcinoma of the breast in pregnancy and lactation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **4**: 693-698, 1978
- CLARK, G.M.; DRESSLER, L.G.; OWENS, M.A.; POUNDS, G.; OLDAKER, T.; Mc GUIRE, W.L.** Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N. Engl. J. Med.*, **320**:627-633, 1989.
- CHANG, K.J.; ENKER, W.E.; MELAMED, M.** Influence of tumor cell DNA ploidy on the natural history of rectal cancer. *Am. J. Surg.* **153**:184-188, 1987.
- CHEEK, J.H.** Cancer of the breast and pregnancy and lactation. *Am. J. Surg.* **126**:729-731, 1973.

- CHEVALIER,B.; HEINTZMANN, F.; MOSSERI, V.;DAUCE,J.P.;**
BASTIT, P.; GRAIC, Y.; BRUNELLE, P.; BASUYAU,J.P.; COMOZ,
M.; ASSELAIN, B. Prognostic value of estrogen and progesterone
 receptors in operable breast cancer: results of a univariate and multivariate
 analysis. **Cancer**, **62**: 2517-24, 1988.
- CONTESSO, G.; MOURIESSE, H.; FRIEDMAN, S.; GENIN. J.;**
SARRAZIN, D.; ROVESSE, J. The importance of histologic grade in long-
 term prognosis of breast cancer .A study of 1010 patients,uniformly treated,
 at the Institut Gustave Roussy.**J. Clin. Oncol.**,**5**: 1378-86, 1987.
- COLOMB, E., KOPP, F.; SPYRATOS, F.; MARTIN, P.M.** Cell-cycle
 studies by multiparametric automatic scanning of topographically preserved
 cells in culture. **Cytometry** **10**:263-272, 1989.
- CONWAY, F.J.** A proposed model of cancer as the inappropriate expretion of
 non-body introns. **J. Theor. Biol.** **100**:1-24, 1983.
- COOPER, B.R. & BUTTERFIELD, J.** Pregnancies subsequent to mastectomy
 for cancer of the breast. **Ann. Surg.** **171**:429-433, 1970.
- DAGNELIE, P.** Théorie et méthodes statistiques . Applications agronomiques.
 Volume 2. **Presses Agronomiques de Gembloux**, 1975
- DAVIS, B.W.; GELBER, R.; GOLDBIRSCH, A.; HARTMANN, W.H.;**
HOLLAWAY, L.; RUSSEL, I.; RUDENSTAM, C.M. Prognostic
 significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant
 therapy for breast cancer with axillary lymph node metastases. **Hum. Pathol.**
16 : 1212-8, 1985.
- de LAUNOIT, Y.** Thèse de doctorat es Sciences, intitulée: "Contribution de
 l'analyse d'images, l'étude de l'influence des hormones sur la prolifération
 cellulaire et la texture de la chromatine de diverses tumeurs. Mise au point
 d'un système expert d'aide au diagnostic anátomopathologique et à l'étude de
 nouvelles drogues antinéoplasiques". **Université Libre de Bruxelles**, 1989.
- de LAUNOIT, Y. & KISS, R.** In vivo influence of androgens of the cell
 kinectics and chromatin pattern of the MXT mouse mammary tumor treated
 or not by aminogluthetimide. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** **115**:129-138,
 1989.

- de LAUNOIT, Y.; KISS R.; DANGUY, A.** Influence of smears preparation and fixatives on DNA ploidy and morphonuclear features of the MXT mouse mammary tumor and normal murine tissues. **Cytometry** 11:691-699, 1990.
- DEPREZ, C.; de LAUNOIT, Y.; KISS, R.; PETEIN, M.; PASTEELS, J.L., VERHEST, A.; VAN VELTHOVEN, R.** Computadorized morphonuclear cell image analysis of malignant disease in bladder tissues. **J. Urol.** 143:694-699, 1990.
- DE VITTA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A.** Cancer: Principles & Practice of Oncology. J.B. Lippincott Company, 4th edition, Philadelphia, 1993.
- DI SAIA, P.J.** Hormone-replacement Therapy in Patients with breast cancer. **Cancer**, 4: 1490-1500, 1993.
- DOLL, D.C.; RINGENBERG, Q.S.; YARBRO, J.W.** Antineoplastic agents and pregnancy. **Semin. Oncol.** 16:337-346, 1989.
- D'OLNE, D.; KISS, R.; COIBION, M.; VERSTRAETE, M.; GUENIER, C.; de LAUNOIT, Y.; VERHEST, A.; PASTEELS, J.L.; DE MARTYNOFF, G.; PARIDAENS, R.; BURNY, A.** Detection of human papiloma viruses 16-18 in cervical cells by molecular hybridization: Relationship with morphonuclear cell image analysis. **Modern Pathol.** 2:658-665, 1989.
- DONALD, C.D.; RINGENBERG, Q.S.; YARBRO, J.W.** Management of cancer during pregnancy. **Arch. Intern. Med.** 148: 2058-2064, 1988.
- DONEGAN, W.L.** Breast cancer and pregnancy. **Obstet. Gynecol.** 50:177, 244-252, 1977.
- DONEGAN, W.L.** Cancer and pregnancy. **CA.** 33 : 4 : 194-214 1983
- DRESSLER, L.G. & BARTOW S.A.** DNA flow cytometry in solid tumors: Practical aspects and clinical application. **Sem. Diag. Pathol.** 6: 55-82, 1989.

- ELLEDGE, R.M.; CIOCCA, D.R.; LANGONE, G.; MCGUIRE, W.** Estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2/NEU protein in breast cancer from pregnant patientes. **Cancer** 71:2499-2506,1993.
- ETIEVANT C.; KRUCZYNSKI A.; PAUWELS O.; KISS R.** The combination of the terazolium derivative reduction (MTT) and digital cell image analysis to monitor in vitro the cytotoxicity of anti-neoplastic drugues. **Anticancer Res.** 11:305-312,1991.
- FEULGEN, R., ROSSENBECK, H.** Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom typus der thimonuceinsäure und die darauf besuehnde elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen preparaten. **Z. Physiol. Chem.** 135: 203-248, 1924.
- FISCHER E.R.; RESMOND C.; FISCHER B.** A perspective concerning the relation of duration of symptons to tratment failrure in patients with breast cancer. **Cancer**, 40:3160-3167,1977.
- GALERA-DAVIDSON H.; BIBBO M.; DYTCH H.E.** Nuclear DNA in anaplastic thyroid carcinoma with differentiated component. **Histophatology** 11:715-722, 1987.
- GALLEMBERG, M.H. & LOPRINZI, C.L.** Breast cancer and pregnancy. **Seminars in Oncology**, 16: 369-76, 1989.
- GALLOWAY, M.M.** Texture analysis using gray run length. **Computer graphics image processing** 4:172-179, 1975.
- GARBAY C.** Cours de traitement d'images, troisième année en SIMAG et DEA d'informatique. U.S.M. Grenoble et INP Grenoble, 1982.
- GASPERIN, P.; GOZY M.; PAUWELS O.; FRUHLING J.; VAN HOUTTE P.; PASTEELS J.L.; KISS R.** Monitoring of radiotherapy-induced morphonuclear modifications in the MXT mouse mammary carcinoma by means of digital cell image analysis. **Int. J. Radiot. Oncol. Biol. Phys.** 22: 979-987, 1992.
- GHALI V.S.; LIAU S.; TEPLITS C.; PRUDENTE R.** A comparative study of DNA ploidy in 115 fresch-frozen breast carcinomas by image analysis versus flow cytometry. **Cancer** 70:2668-2672, 1992.

GIARETTI W.; DANOVA M.; GEICLO E.; MASINNI G.; SCIALLERO S.; ASTE H.; SCIVETTI P.; RICCARDI A.; MARSANO B.; MERLO F.; D'AMORE E. Flow cytometric DNA index in the prognosis of colorectal cancer. **Cancer** 67:1921-1927, 1991.

GIROUD F. Thèse de Doctorat es Sciences, intitulée: "Approches cytométriques de la prolifération et de la différenciation: notion de faciès chromatinien ". Université Scientifique, Technologique et Médicale de Grenoble, 1987.

GIROUD F. & MONTMASSON M.P. Reevaluation of optimal Feulgen reaction for automated cytology. Influence of fixatives. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** 11:87-95, 1989.

GREENE F.L. & LEIS H.P. Management of breast cancer in pregnancy : a thirty-five year multi institutional experience. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.** 8:25-32, 1989.

HAAGENSEN, C.D. Cancer of the breast in pregnancy and lactation **Am. J. Obstet. Gynecol.** 98:141-149, 1967.

HAAGENSEN C.D. & STOUT, A.P. Carcinoma of the breast. **Ann. Surg.** 118: 859-70, 1943.

HARALICK R.M.; SHANMUGAN T.; DINSTEN I. Textural features for image classification. **IEE Trans Syst Man Cybern SMC** 3:610-621, 1973.

HARRINGTON, S.W.: Carcinoma of the breast. Results of surgical treatment when the carcinoma occurred in the course of pregnancy or lactation and when pregnancy occurred subsequent to operation. **Ann Surg** 106: 690-700, 1937.

HEDLEY D.W.; FRIEDLANDER M.L.; TAYLOR I.W. ET AL. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. **J. Histochem. Cytochem.** 31:1333-1335, 1983.

- HIDDEMAN W.; SCHUMANN J.; ANDREEFF M.; BARLOGIE B.; HERMAN C.J.; LEIF R.C.; MAYALL B.H.; MURPHY R.F.; SANDBERG A.A.** Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry*, **5**: 445-446, 1984.
- HIETANEN, P.; MIETTINEN, M.; MAKINEN, J.** Survival after first recurrence in breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **22**: 913-9, 1986.
- HOLLEB A.I. & FARROW J.H.** The reaction of the carcinoma of the breast in pregnancy in 283 patients. *Surg. Gynecol. Obstet.* **115**:65-71, 1962.
- HOLDAWAY,I.M.;MASON, B.H.; KAY, R.G.:** Steroid hormone receptors in breast tumors presenting during pregnancy or lactation. *J.Surg. Oncol.* **25**: 38-41, 1984
- HOLLINGSWORTH, R.E. & LEE, W.H.** Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**:91-96,1991.
- HOOVER, C.H.** Carcinoma of the breast in pregnancy and lactation, In: **BLAND, K.I. & COPELAND, E.M.** (ed)- *The breast:comprehensive management of benign and malignant disease*. Philadelphia, Saunders, 1991.p. 1034-40, 1991.
- ISHIDA, T.; YOKOE, T.; KASUMI, F.; SAKAMOTO,G.; MAKITA,M.; TOMINAGA,T.; SIMOZUMA, K.; ENOMOTO, K.; FUGIWARA K.; NANASAWA, T.** Clinicopathologic characteristics and prognosis of breast cancer patients associated with pregnancy and lactation: Analysis of case-control study in Japan. *Jpn. J.Cancer Res.*,**83**: 1143-9, 1992.
- JANNOT, M.C.; KRUCZYNSKY, A.; LIMOUZY, A.; GANGOU, J.M.; SELVES, J.; DELSOL, G.; MARTINEZ, J.; KISS, R.** Spontaneous evolution of cytoplasmic lectin binding and the nuclear size and DNA content in human colorectal cancers grafted onto nude mice. *Lab. Invest*, **68**: 446-445, 1993.
- JONES, S.E.; STRINGER, C.A.; DORR, T.R.** Cancer treatment in pregnant women. A.S.C.O. abstracts meeting, 1991.

- KALLIONIEMI, O.-P.; BLANCO, G.; ALAVAIIKKO, M.; HIETANEN, T.; MATILLA, J.; LAUSLAHTI, K.; LEHTINEN, M.; KOIVULA, T.** Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. A proposed classification of DNA histograms in breast cancer. **Cancer**, **62**: 2183-90, 1988.
- KATMENTSKEY, L.A. & MELAMED, M.R.** Spectrophotometer cell sorter. **Science** **156**:1364-1365, 1967.
- KATMENTSKEY, L.A.; MELAMED, M.R. DERMAN H.** A new ultra-rapid cell spectrophotometer: Preliminary observation of ultraviolet absorption in various human cells. IBM Research Report, 1965.
- KING, R.M.; WELCH, J.S.; MARTIN, K.; COULAM, C.B.** Carcinoma of the breast associated with pregnancy. **Surg. Gynecol. Obstet.** **160**:228-232, 1985.
- KILGORE, A.R.** Tumors and tumors-like lesions of breast in association with pregnancy and the lactation (with a note by Bloodgood JC). The treatments of the tumors of the breast during the pregnancy and the lactation. **Arch. Surg.** **18**:2079-2098, 1929.
- KISS, R.** Thèse de Doctorat es Sciences, intitulée: "Contribution à l'étude de l'homonodépendance de une tumeur expérimentale murine et de cancers mammaires primitifs canis et humains". Université Libre de Bruxelles, 1987.
- KISS R.; GASPERIN P.; VERHERS A.; PASTEELS J.L.** Modification of the tumor ploidy level by the choice of the tissue taken as diploide reference in digital cell image analysis of Feulgen stained nuclei. **Modern. Pathol.** **5**:655-660, 1992.
- KISS, R.; LARSIMONT, D.; HUVOS, A.G.** Digital cell image analysis of Ewing's sarcomas. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** **13**:356-362, 1991.
- KOENIG, S.H.; BROWN, R.D.; KAATNENSTKY, L.; SEDLIS, A.; MELAMED, M.R.** A report of the efficacy a rapid cell spectrophotometer in screening for cervical cancer. **Cancer** **21**:1091-1096, 1968.

- KOSS, L.G.; CZERNIAK, B.; HERZ, F.; WERSTO, R.P.** Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal. *Hum. Pathol.* 20:528-548,1989.
- KOURI, M.; PYRHÖNEN, S.; MECKLIN, J.P.; JÄRVIENEN, H.; LAASONEN, A.; FRANSSILA, K.; NORDLING, S.** The prognostic value of DNA ploidy in colorectal carcinoma: a prospective study. *Br. J. Cancer* 62:976-981,1990.
- KRUCZYNSKY, A.; PAUWELS, O.; DELSOL, G.; WRIGHT, M.; KISS, R.** Spontaneous evolution of morphonuclear features of human lung xenografted cancers monitored by means of computerized cell image analysis. *Cytometry* 13:586-594,1992.
- LARSIMONT, D.; KISS, R.; D'OLNE, D.; DE LAUNOIT, Y.; MATTHEIEM, W.; PARIDAENS, R.; PASTEELS, J.L.; GOMPEL, C.** Correlation between nuclear cytomorphometric parameters and the estrogen receptor levels in breast cancer. *Cancer* 63:2162-2168,1989a.
- LARSIMONT, D.; KISS, R.; D'OLNE, D.; DE LAUNOIT, Y.; MATTHEIEM, W.; PARIDAENS, R.; PASTEELS, J.L.; VERHEST A.** Relationship between computerized morphonuclear image analysis of breast cancer and histopathological grading. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 11:433-439,1989b.
- LEE, T.K.; MYERS, R.T.; BOND, M.G.; MARSHALL, R.B.; KARDON B.** The significance of nuclear diameter in the biologic behavior of thyroid carcinomas: a retrospective study of 127 cases. *Hum. Pathol.* 18:1252-1256,1987.
- LEPRINCE-RINGUET L.** Noces the diamant avec l'atome. Flammarion, 1991.
- LEVI P.E.; COOPER E.H.; PHIL D.; ANDERSON C.K.; PATH M.C.; WILLIAMS R.E.** Analyses of DNA content, nuclear size and cell proliferation of transitional cell carcinoma in man. *Cancer* 23: 1074-1085, 1969.

LIVINGSTONE, L.R.; WHITE, A.; SPROUSE, J.; LIVIANOS, E.; JACKS, T.; TISTY, T.B.

Altered cell cycle arrest and amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. 70:923-935, 1992.

MELAMED M.R.; LINDMO T.; MENDELSON M.L. Flow cytometry and sorting. In: _____ New York. Wiley-Liss 1991.

MOSTOFI, F.K. Grading of prostatic carcinoma. *Cancer Chemoter. Resp.*: 59: 111-17, 1975.

MAX, M.H. & KLAMER, T.W. Breast cancer in 120 women under 35 years old. *Am. Surg.* 50: 23-5, 1984.

MILLER, B.E.; LAVIA, L.A.; HORBELT, D.V. The prognostic value of image analysis in ovarian cancer. *Cancer* 67:1318-1321, 1991.

MURRAY, C.L.; REICHERT, J.A.; ANDERSON, J.; TWIGGS, C.B. Multinodal cancer therapy for breast cancer in the first trimester of pregnancy. *Jama*, 252: 2607-2608, 1984.

NUGENT, P.; O'CONNEL, T.X. Breast cancer and pregnancy. *Arch Surg*-v 120, nov 1985.

OPFERMAN, M.; BRUGAL, G.; VASSILAKOS, P. Cytometry of breast carcinoma: significance of ploidy balance and proliferation index. *Cytometry*, 8 ; 217-224, 1987.

PARENTE, S.T.; AMSEL, M .; LERNER, R.; CHINEA, F. Breast Cancer Associated With Pregnancy. *Obstet-Gynecol* 71-6: 861-864, 1988.

PETEIN, M.; DE LAUNOIT, Y.; KISS, R.; DEPREZ, C.; CROLS, K.; PASTEELS, J.L.; VERHEST, A.; VAN VELTHOVEN, R . Characterization of the morphonuclear features and DNA ploidy of prostatic disease. *The Prostate* 16: 199-208, 1990.

- PETEIN, M., MICHEL P.; VAN VELTHOVEN, R.; PASTEELS, J.L.; BRAWER, M.; DAVIS, J.R.; NAGLE, R.; KISS, R.** Morphonuclear relationship between prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and cancers as assessed by digital cell image analysis. **Am J Clin Pathol**, **96**: 628-634, 1991.
- PETERS, M.V.**, Carcinoma of the breast associated with pregnancy. **Radiology** **78**: 58-67, 1962.
- PETERS, M.V. & MEAKIN, J.W.** The influence of pregnancy in carcinoma of the breast. **Prog. Clin. cancer**, **1**: 474-477, 1965.
- PETREK, J.A.; DUKOFF, R.; ROGATKO, A.** Prognosis of Pregnancy Associated breast cancer. **Cancer**, **67** : 1991.
- PIKE, M.C.; KRAICO, M.D.; HENDERSON, B.E.** Hormonal risk factors, breast tissueage, and the age-incidence of breast cancer. **Nature**, **303**: 767-770, 1983.
- RIBEIRO, G.G. & PALMER, M.K.** Breast carcinoma associated with pregnancy: a clinician's dilemma. **Br. Med. J.**, **2**: 1524-1527, 1977.
- RIBEIRO, G.G.; JONES, D.A.; JONES, M.** Carcinoma of the breast associated with pregnancy. **Br. J. Surg.**, **73**: 607-609, 1986.
- ROSEMOND, G.P. & MAIER, W.P.** Pregnancy and carcinoma of the breast **Gynec.Obstet** . I Chapter 67 , 1988.
- ROSEN, P.P.; LASSER, M.L.; KINNE, D.W.; BEATTIE, E.J.** Breast carcinoma in women 35 years of age or younger . **Ann Surg** ; **199** : 133-141, 1984.
- RUSSO,J.; FREDERICK, J.; OWNBY, H.E.; FINE, G.; HUSSAIN, N.; KRICKSTEIN, H.I.; ROBBINS, T.O.; ROSEMBERG, B.** Predictors of recurrence and survival of patients with breast cancer. **Am. J. Clin. Pathol.**, **88**: 123-31, 1987.

- SALMON, I.; KISS, R.; DEWITTE, O.; GRAS, T.; PASTEELS, J.L.; BROTCI, J.; FLAMENT-DURAND, J.** Relationship between histopathological grading and DNA ploidy as opposed to survival in 206 astrocytic tumors. **Cancer** 70:538-546, 1992.
- SALMON, I.** Contribution de la description quantitative du facies chromatinien pour l'aide au diagnostic et au pronostic des tumeurs de la glande thyroïde et du système nerveux. Bruxelles, 1993. (Travail de thèse effectué en vue de l'obtention du titre d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur - Université Libre de Bruxelles).
- SCHULTZ, N.; VANDE WOUDE G.F.** Oncogenes, the cell cycle, and mos proto-oncogene function. In: Molecular foundations of oncology Baltimore: Broder S, ed. 1991.
- SIEGEL, S. & CASTELMAN, J.** Non parametrics statistics for the behavioral sciences. In: _____ New York : McGraw Hill 2ème édition 1988.
- SUTTON, R.; BUDZAR, A.; HORTOBAGYI, G.N.** Pregnancy and offspring after adjuvant chemotherapy in breast cancerpatients . **Cancer** 65 : 847-850, 1990.
- TAYLOR, S.R. & LOCKER, J.** A comparative analysis of nuclear DNA content and N-myc gene amplification in neuroblastoma. **Cancer** 65 : 1360-1366, 1990.
- THORPE, S.M.** Monoclonal antibody technique for detection of estrogen receptors in human breast cancer: greater sensitivity and more accurate classification of receptor status than the dextran-coated charcoal method. **Cancer Res.**, 47: 6572-5, 1987.
- TREVES, N. & HOLLEB, A.I.:** A report of 549 cases of breast cancer in women 35 years of age or younger. **Surg. Gynecol. Obst.** 107: 271-83, 1958.
- TRIBUKAIT, B.** Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of ginto-urinary neoplasms . **World. J. Urol.** 5: 108-122, 1987.

- TUBIANA, M.** Cinética de proliferación de la célula tumoral y velocidad de crecimiento de tumores. In: **Veronesi , U.**(coord). **Advances en Oncologia.** Milano-European School of Oncology, 1990. v.1, p.1-17.
- VERHEST, A.; KISS R.; D'OLNE D.; LARSIMONT, D.; SALMON, I.; de LAUNOIT, Y.; FOURNEAU, C.; PASTEELS, J.L.; PECTOR, J.C.** Characterization of human colorectal mucosa, polyps and cancers by means of computerized morphonuclear image analysis . **Cancer 65:** 2047-2054, 1990.
- von NEUMANN J.** L'ordinateur et le cerveau . Traduit de l'américain (The computer and the brain , von Neumann , 1957) par Pascal Engel . Editions La Découverte , 1992.
- WALLACK, M.K.; WOLF, J.A.Jr.; BEDWENCK, J.** Gestational carcinoma of the female breast. *Curr. Probl. Cancer.* 7: 1-58, 1983.
- WEBER J.E.; BARTELS P.H.; BARTELS, H.G.** Discrimination of DNA ploidy pattern by order statistics. *Anal .Quant. Cytol. Histol.* 9: 60-68 , 1987.
- WEBER J.E.; BALDESSARI B.A.; BARTELS P.H.** Test statistics for detecting aneuploidy and hyperploidy . *Anal .Quant. Cytol. Histol.* 7: 131-139,1985.
- WHITE, T.T.** Carcinoma of the breast in the pregnant and the nursing patient. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 69: 1277-86, 1955.
- WHITE, T.T. & WHITE, W.C.** Breast cancer and pregnancy, a report of 49 cases followed 5 years . *Ann. Surg.* 144: 384-93 1956.
- WIED G.L.; BARTELS P.H.; BIBBO M.; DYTCH H.E.** Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Hum .Pathol.* 20: 549-571,1989.
- WILLEMESE P.H.B. & VAN DER SIJDE.** Combination chemotherapy and radiation for stage IV breast cancer during pregnancy . *Gyneco. Oncol.* 36: 281-284,1990.